

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE

Dragan Lj. Knežević

**ISPITIVANJE FAKTORA KOJI UTIČU NA
ZASTUPLJENOST HORMONA U SIROVOM I
KONZUMNOM MLEKU KRAVA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2025

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Dragan Lj. Knežević

**EXAMINATION OF FACTORS THAT AFFECT
THE HORMONES CONTENT IN RAW AND
COMMERCIAL COW'S MILK**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2025

MENTORI:

dr **Danijela Kirovski**, redovna profesorka, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

dr **Željko Sladojević**, viši naučni saradnik, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr **Ivan Vujanac**, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

dr **Olivera Valčić**, vanredna profesorka, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

dr **Tomaž Snoj**, vanredni profesor, Veterinarski fakultet Univerziteta u Ljubljani

Datum odbrane:

ISPITIVANJE FAKTORA KOJI UTIČU NA ZASTUPLJENOST HORMONA U SIROVOM I KONZUMNOM MLEKU KRAVA

REZIME

Istraživanje je obuhvatilo određivanje koncentracije hormona u mleku krava u različitim fazama laktacije, mleku iz laktofriza i maloprodajnom mleku. Uzorci mleka i krvi prikupljeni su 10., 30., 60., 90., 150., 180., 210., 250. i 280 dana laktacije od četrnaest krava holštajn rase i u njima su određivane koncentracije hormona, masti i proteina u mleku i biohemijskih parametara krvi. U iste svrhe uzorkovano je mleko iz laktofriza i nabavljeno je komercijalno mleko sa 1,5% i 3,2% mlečne masti. Koncentracije insulinu-sličnog faktora rasta-1 (IGF-1) u mleku bile su značajno niže 90., 150., 180., 210. i 250. dana i značajno više 10., 30. i 60. dana laktacije poredeći sa laktacionim prosekom (LP). Insulin je imao značajno niže koncentracije u mleku 30., 60. i 90. dana i značajno više koncentracije 210., 250. i 280. dana laktacije poredeći sa LP. Koncentracija slobodnog tiroksina je bila viša 250. dana, dok je nivo slobodnog trijodotironina bio značajno niži 30., 60., 90. i 280. dana i značajno viši 10. i 180. dana u poređenju sa odgovarajućim LP. Nivo kortizola u mleku je bio niži 60. i 280. dana laktacije poredeći sa LP. Koncentracije progesterona određene 10., 30., 60. i 90. dana su bile statistički značajno niže a koncentracije određene 150., 180., 210. i 250. dana značajno više u odnosu na LP. Koncentracije estrogena određene 10., 30., 60., 90. i 150. dana su bile značajno niže a koncentracije 180., 210. i 250. dana značajno više u odnosu na LP.

Svi hormoni su imali značajno niže koncentracije u komercijalnom mleku sa 1,5% masti nego u komercijalnom mleku sa 3,2% masti, mleku iz laktofriza i LP. Izuzetak je LP za IGF-1, koji je bio značajno niži nego nivo IGF-1 u komercijalnom mleku sa 1,5% masti, kao i LP za estrogen koji se nije značajno razlikovao u odnosu na nivo estrogena u u komercijalnom mleku sa 1,5% masti. Biohemijski parametri krvi su blago fluktuirali tokom laktacije, ali su ostali u referentnom opsegu. Koncentracije hormona u kravljem mleku fluktuiraju tokom laktacije, što daje značaj mleku u kontekstu javnog zdravlja.

Ključne reči: krave, hormoni mleka, zdravlje potrošača

Naučna oblast: veterinarska medicina

EXAMINATION OF FACTORS THAT AFFECT THE HORMONES CONTENT IN RAW AND COMMERCIAL COW'S MILK

SUMMARY

The study aimed to determine the concentration of hormones in cow's milk sampled from different phases of lactation, bulk-tank milk and retail milk. Milk and blood samples were taken from fourteen Holstein cows on the following days in lactation (DIL): 10, 30, 60, 90, 150, 180, 210, 250 and 280 to determine milk hormones, fat and protein content and blood biochemical parameters. For the same purpose, bulk-tank milk was sampled and samples of retail milk with 1.5% and 3.2% fat was purchased. Milk insulin-like growth factor-1 (IGF-1) values were significantly lower at 90, 150, 180, 210 and 250 and significantly higher at 10, 30 and 60 DIL than lactation average (LA). Milk insulin concentrations were significantly lower at 30, 60 and 90 and higher at 210, 250 and 280 DIL than LA. Free thyroxine level in the milk was higher at 250 DIL, while milk free triiodothyronine concentrations were lower at 30, 60, 90 and 280 DIL, and significantly higher at 10 and 180 DIL than respective LA. Milk cortisol levels were lower at 60 and 280 DIL than LA. Milk progesterone concentrations were significantly lower at 10, 30, 60 and 90 and significantly higher at 150, 180, 210 and 250 DIL than lactation average (LA). Milk estrogen concentrations were significantly lower at 10, 30, 60, 90 and 150 and significantly higher at 180, 210 and 250 DIL than lactation average (LA)

All measured milk hormones were significantly lower in retail milk with 1.5% fat compared to retail milk with 3.2% fat, bulk-tank milk and LA. An exception was the LA of IGF-1, which was significantly lower than the IGF-1 content in retail milk with 1.5% fat as well as the LA of estrogen, which did not significantly differ compared to the estrogen content in retail milk with 1.5% fat. Blood biochemical parameters fluctuated evenly during lactation and were within the reference range. Hormone concentrations in cow's milk fluctuate during lactation, giving milk an important role in the context of public health. Keywords: cows, milk hormones, consumer health

Key words: cows, milk hormones, consumer health

Scientific field: veterinary medicine

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. PREGLED LITERATURE | 2 |
| 2.1. Sastav mleka krava..... | 2 |
| 2.2. Hormoni prisutni u mleku krava | 7 |
| 2.3. Hormoni prisutni u mleku krava kao potencijalni rizik za zdravlje ljudi | 11 |
| 3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA | 16 |
| 4. MATERIJAL I METODE RADA..... | 17 |
| 4.1. Eksperimentalne životinje | 17 |
| 4.2. Uzorkovanje..... | 18 |
| 4.3. Analize krvi | 18 |
| 4.4. Analize mleka | 19 |
| 4.5. Statistička analiza..... | 19 |
| 5. REZULTATI..... | 20 |
| 5.1. Promene u koncentracijama hormona, masti i proteina (srednja vrednost±SEM) u mleku krava u različitim periodima laktacije | 20 |
| 5.2. Promene u koncentracijama insulina i različitih biohemijskih parametara u krvi ispitivanih krava | 33 |
| 5.3. Servis period ispitivanih krava..... | 43 |
| 6. DISKUSIJA..... | 44 |
| 6.1. Promene u koncentracijama ispitivanih hormona u mleku krava u različitim periodima laktacije..... | 44 |
| 6.2. Promene u koncentracijama ispitivanih organskih sastojaka mleka | 49 |
| 6.3. Promene u koncentracijama insulina i različitih biohemijskih parametara u krvi ispitivanih krava | 50 |
| 7. ZAKLJUČCI..... | 53 |
| 8. LITERATURA..... | 54 |

1. UVOD

Hormoni su fiziološki prisutni u mleku krava. To su biološki aktivne materije koje imaju značajne funkcije u organizmu. U mleku krava prisutni su hormoni proteinske, odnosno peptidne i steroidne strukture, kao i derivati aminokiselina. Od hormona proteinske odnosno peptidne strukture izdvajaju se insulin, hormon rasta i insulinu slični faktori rasta 1 i 2 (IGF-1 i IGF-2), dok se od hormona steroidne prirode izdvajaju kortizol, estrogeni i progesteron. Od hormona derivata aminokiselina prisutni su tireoidni hormoni. Pojedini od ovih hormona se koriste u dijagnostici graviditeta krava (estrogeni i progesteron), dok su drugi značajni indikatori metaboličkog zdravlja krava (proteinski hormoni i kortizol). Hormoni mleka kao biomarkeri bolesti kod krava dobijaju sve više na značaju jer je uzorkovanje mleka, za razliku od krvi, neinvazivno i može se sprovoditi pri svakoj muži. Takođe, pojedini hormoni prisutni u kolostrumu i mleku krava pozitivno utiču na rast i razvoj teladi. Međutim, hormoni prisutni u mleku i proizvodima od mleka mogu, pored sopstvenog potomstva, uticati na zdravlje i drugih vrsta koji konzumiraju mleko krava, uključujući i ljude, kako pozitivno tako i negativno.

Veliki broj različitih faktora utiče na sadržaj hormona u mleku krava. Najznačajniji su vreme laktacionog ciklusa, prisustvo masti u mleku, ishrana i genetički potencijal, metabolički i reproduktivni status jedinke. Naime, fiziološki se koncentracija hormona značajno menja tokom laktacionog ciklusa odnosno sa promenom metaboličkog statusa krava, a pogotovo ukoliko je životinja u laktaciji istovremeno i gravidna, a što je čest slučaj u intenzivnoj proizvodnji. U odnosu na period od pre nekoliko decenija, laktacija kod krava je značajno produžena, od prvobitnih 4 do 5 meseci posle teljenja do današnjih i do 10 meseci posle teljenja. Uzimajući u obzir da se koncentracija većine hormona u mleku povećava s napredovanjem laktacije, koja se kod krava u intenzivnoj proizvodnji udružuje s rastućim graviditetom, sve je češći slučaj da se visokogravidne krave, koje su hormonski vrlo opterećene, koriste za proizvodnju mleka. Kao posledica toga u konzumnom mleku i proizvodima od mleka može se naći prekomerna količina hormona koja može da ugrozi zdravlje ljudi. S druge strane, većina hormona u mleku je vezana za lipidnu frakciju zbog čega proces obrade mleka značajno utiče na koncentraciju hormona u konzumnom mleku. Naime, smatra se da mleko s manjim procentom masti sadrži manje hormona. Treba takođe naglasiti da se termičkom obradom, pasterizacijom i sterilizacijom, u većini slučajeva ne smanjuje koncentracija hormona u mleku. Kod procene uticaja mleka na zdravlje ljudi, ne sme se izgubiti iz vida mogući kumulativni efekat unosa hormona putem mleka. Metabolički i reproduktivni status krava takođe može da utiče na sadržaj hormona u mleku krava. Naime, izrazita metabolička opterećenja kojima su izložene krave tokom laktacije izaziva takvo hormonalno prestrojavanje unutar organizma koje može da ima uticaj i na hormonalni status krava.

Poslednjih godina se u literaturi uočava trend povećanog interesovanja za mogući uticaj hormona prisutnih u mleku krava na zdravlje ljudi ali se manje pažnje obraća na faktore kojima se može uticati na sadržaj hormona u sirovom, a time i konzumnom mleku. Analizom podataka koji uključuju određivanje metaboličkog i reproduktivnog statusa krava, faze laktacije i sadržaja nutrijenata u mleku krava (prevažodno masti) može se doći do značajnih podataka koji bi omogućili uspostavljanje prediktivnog modela o sadržaju pojedinih hormona u mleku krava u različitim fazama proizvodno reproduktivnog ciklusa.

2. PREGLED LITERATURE

Mleko je proizvod mlečne žlezde koji počinje da se izlučuje ubrzo nakon teljenja krava. Sadrži značajnu količinu makro i mikronutrijenata, imunoglobuline, peptide sa antimikrobnom aktivnošću i hormone. Njegova uloga je prevashodno u obezbeđivanju nutritivne i imunske podrške mladuncima, čime se omogućava pravilan rast i razvoj potomstva. To je primarna uloga izlučenog mleka. Kolostrum, kao prvo mleko majke koje se izlučuje 24 do 36 sati nakon teljenja (Playford i Weiser, 2021), ima visoku koncentraciju svih komponenata koji se kasnije nalaze u mleku, pa se često koristi kao komercijalni proizvod u mlečnoj industriji, sa ciljem da poboljša zdravlje i imunske funkcije kod ljudi odnosno konzumenata. Takođe, kolostrum se koristi u terapiji različitih bolesnih stanja kod ljudi i dece (Panahi i sar, 2010; Playford i sar., 2001) kao i kod sportista u cilju postizanja visokih performansi kod treninga kao i oporavka (Buckley i sar., 2003). S obzirom da upotreba kolostruma ali i mleka krava nije ograničena u ishrani ljudi, poslednjih godina se sve više obraća pažnja na efekte koje mleko može da ima na zdravlje ljudi, ne samo one pozitivne već eventualno i negativne (Thorning i sar., 2016). Pored sve češće debate o sve učestalijoj intoleranciji na laktozu kod dece (Heyman, 2006) i deficitu gvožđa kod dece koje konzumiraju prekomerne količine kravljeg mleka (Oliveira i Osório, 2005), razvija se u stručnoj literaturi i polemika koja se odnosi na mogući uticaj prekomerne konzumacije mleka na povećanu sklonost konzumenata ka određenim oblicima kancera (Melnik i sar., 2023).

2.1. Sastav mleka krava

Mleko se sastoji od makro i mikronutrijenata i biološki aktivnih materija. Od nutrijenata su prisutni proteini i peptidi, ugljeni hidrati, masti, vitamini i minerali dok su od biološki aktivnih materija prisutni antimikrobni faktori, kao što su imunoglobulini, citokini, imunoregulatori, hormoni i faktori rasta. Uloga mleka je prevashodno da obezbedi nutritivnu podršku i imunsku zaštitu mladuncima sopstvene vrste. Jedino se kompletnom analizom sastava mleka, odnosno svih njegovih komponenti, može dobiti jasan uvid u krajnju vrednost mleka za konzumenta kao i u način na koji prisustvo ovih sastojaka utiče na iskoristivost i biološku aktivnost hormona mleka.

Proteini i peptidi su u mleku krava prisutni u količini od 3% u odnosu na sve sastojke, što je značajno manje od količine u kojoj su prisutni u kolostrumu, a to je 15% u odnosu na sve sastojke. Proteini prisutni u mleku se dele u dve grupe: proteine surutke koji predstavljaju rastvorljivu komponentu i kazein koji je nerastvorljiva komponenta. **Proteini surutke** se sastoje od imunoglobulina, laktoferina, α -laktoglobulina, β -laktoglobulina, laktoperoksidaze, glikomakropeptida i nekoliko hormona, odnosno faktora rasta (Bastian i sar., 2001). α -laktoglobulin u kolostrumu krava čini 40% sadržaja surutke, odnosno četvrtinu sadržaja ukupnih proteina (Kuiken i sar., 1949) i značajan je izvor aminokiselina. β -laktoglobulin je takođe značajan izvor aminokiselina ali je i glavni imunogen za konzumente koji pate od alergije na kravlje mleko. Naime, poznato je da β -laktoglobulin nije prisutan u humanom mleku. Inače, proteini surutke imaju nutritivnu, ali i biološku aktivnost koju ispoljavaju tek nakon aktivacije odnosno nakon izlaganja kiselinama i delimične digestije. Biološke aktivnosti uključuju imunsku aktivnost i smanjenje inflamatorne reakcije. Dodatno, pojačavaju reparaciju tkiva, jer je, na primer, dokazano da α -laktoglobulin smanjuje oštećenje creva koje kod pacova uzrokuje etanol (Matsumoto i sar., 2001). Takođe, proteini surutke imaju antimikrobnu i antikancerogenu aktivnost (Nciuc i sar., 2010). Dokazano je da hidrolizati surutke interaguju sa receptorima značajnim za urođeni imunski odgovor (Kiewiet i sar., 2017). **Kazein** je globularni protein čiji su molekuli organizovani u vidu agregata koji se nazivaju micela i koje su sastavljene od submicela. Unutar micela su prisutne četiri frakcije kazeina i to su $\alpha 1$, $\alpha 2$, β i κ . Kazein čini 75% svih proteina mleka, pri čemu je $\alpha 1$ -kazein najzastupljenija proteinska frakcija u mleku (Ginger i sar., 1999). Kazein sadrži peptide koji

imaju aktivnost opioida za koje je dokazano da smanjuju eliminaciju sadržaja creva kod pacova (Daniel i sar., 1990). Kazein utiče na imunsku aktivnost, kako je dokazano u ogleđima *in vitro* (Pessi i sar., 2001) i *in vivo* (Meister i sar., 2002). Značajno je da kazein ima mogućnost da održava funkciju i obezbedi resorpciju pojedinih biološki aktivnih peptida mleka redukujući njihovu razgradnju od strane digestivnih enzima, i to tako što postaje njihov kompetitivni supstrat (Playford i sar., 1993). Ova funkcija je slična funkciji tripsin inhibitora koji štiti IgG, faktore rasta i druge biološki aktivne proteine od proteolitičke degradacije u crevima. Zbog toga je tripsin inhibitor, koji je inače prisutan u mleku krava, 100 puta više zastupljen u kolostrumu u odnosu na mleko krava (Godden i sar., 2019). Istraživanja su pokazala da kazein u mleku krava posebno štiti epidermalni faktor rasta (eng. *epidermal growth factor*; skr: EGF) od razgradnje u crevima ljudi (Pleyford i sar., 1993), kao i da je u njegovom prisustvu povećana stabilnost i resorpcija insulinu sličnog faktora rasta-1 (eng: *insulin like growth factor-1*; skr: IGF-1) (Kimura i sar., 1997). Kazein poseduje i druge metaboličke i protektivne efekte kao što je preveniranje eksperimentalne bakterijemije, a koju ostvaruje intenziviranjem mijelopoeze (Kanwar i sar., 2009). Dakle, kazein nije samo nutritivna komponenta mleka već je i komponenta koja poseduje imunoregulatornu, antibakterijsku i antiinflamatornu ulogu.

Ugljeni hidrati su prisutni u mleku i oni obuhvataju, između ostalog, laktozu, oligosaharide, glikolipide i glikoproteine. **Laktoza** je disaharid mleka koji je u kolostrumu zastupljen u količini od 2,5% (Kehoe i sar., 2007), dok je u mleku krava zastupljen u značajno većoj količini (Urashima i sar., 2001). Laktoza, uneta u organizam konzumenta, obezbeđuje jetri dovoljne količine glukoze i galaktoze za dalju sintezu i skladištenje glikogena (Coelho i sar., 2015). **Oligosaharidi** su prisutni u mleku i kolostrumu krava pri čemu je njihova koncentracija u kolostrumu 1 g/l, odnosno dvostruko viša nego u mleku (Ten Bruggencate i sar., 2014). Oligosaharidi mogu delovati kao prebiotici jer se mnogi od njih ne vare u prednjem delu creva, tako da prolaze intaktni u kolon gde služe kao metabolički supstrat za bakterije kolona (Zivkovic i sar., 2011). Oligosaharidi se dele na neutralne i kisele. Neutralni oligosaharidi ne sadrže naelektrisane ugljenohidratne rezidue. Suprotno tome, kiselii oligosaharidi sadrže najmanje jednu negativno naelektrisanu reziduu, odnosno sijalinsku kiselinu (Gopal i sar., 2000) Sijalinski oligigosaharidi čine većinu oligosaharida u kolostrumu krava i oko sedmostruko ih je više u kolostrumu nego mleku krava (Ten Bruggencate i sar., 2014). Pored oligosaharida, kolostrum je bogat u **glikoproteinima**, koji mogu da deluju kao prebiotici zahvaljujući saharidnoj komponenti koja se odvaja bakterijskim glikozidazama, tako utičući na mikrobiom creva. Jedan od značajnijih glikoproteina u kolostrumu je bovini glikomakropeptid koji ima različite glikozilatne forme i formira se tokom digestije proteolizom κ -kazeina. Bovini glikomakropeptid ima sposobnost da podstiče rast *Bifidobacterium longum* podvrste *infantis* (O`Riordan i sar., 2018).

Masti se u kolostrumu mleka nalaze u koncentraciji od oko 7%. Lipidna frakcija sadrži više komponentata koje mogu da utiču na zdravlje ljudi, uključujući ω -3 i ω -6 polinezasićene masne kiseline, konkugovanu linoleinsku kiselinu, kratkolančane masne kiseline, gangliozide i fosfolipide (Bošnjaković i sar., 2024). Masne kiseline u sastavu kolostruma su 65-75% zasićene, 24-28% mononezasićene i 4-5% polinezasićene (Contarini i sar., 2014; O`Callaghan i sar., 2020). Dominantne masne kiseline u kolostrumu su palmitinska i oleinska, koje su zastupljene 40%, odnosno 21% od ukupnih masnih kiselina (O`Callaghan i sar., 2020). Masna komponenta kolostruma se obično uklanja iz komercijalnih preparata da bi se obezbedila stabilnost i mogućnost dalje obrade. Svakako, masne kiseline nisu biološki inertne. Poznato je, na primer, da su gangliozidi i fosfolipidi polarni lipidi koji su uključeni u različite fiziološke funkcije kao što su razvoj neurona, vezivanje patogena i imunska aktivacija (Verardo i sar., 2017). Takođe se smatra da je palmitinska kiselina izuzetno značajna za ishranu u ranom periodu života (Miles i sar., 2017; Bar-Yoseph i sar., 2013), dok se oleinska kiselina

vezuje za benifite kao što su imunomodulacija i zdravlje kardiovaskularnog sistema (Sales-Campos i sar., 2013)

Vitamini i minerali su prisutni u mleku. Kolostrum i mleko sadrže vitamine rastvorljive u mastima (A, D i E), kao i vitamine rastvorljive u vodi (B grupa vitamina), a koji mogu da učestvuju u mnogim metaboličkim procesima uključujući rast kostiju i antioksidativnu aktivnost. Za vitamin D je utvrđeno da podržava imunski sistem i mentalno zdravlje (Cleminson i sar., 2016). Vitamini su uglavnom prisutni u višoj koncentraciji u kolostrumu nego u mleku, posebno vitamini B₂, B₁₂, E i D. U odnosu na mleko, kolostrum je bogatiji u nekoliko esencijalnih minerala uključujući kalcijum, bakar, gvožđe, cink, magnezijum, mangan i fosfor (Godden i sar., 2019; Matsumoto i sar., 2001; Pereira, 2014). U tabeli 1 prikazana je zastupljenost vitamina u kolostrumu krava.

Tabela 1. Koncentracija vitamina u kolostrumu krava (Pakkanen i Aalto, 1997; Kelly i sar., 2003; Kehoe i sar., 2007; Stelwagen i sar., 2009; Pereira, 2014; Bagwe i sar., 2015; Godden i sar., 2019; Bagwe-Parab i sar., 2020)

| Vitamini | koncentracija |
|-------------------------|---------------|
| Tiamin (B1) (µg/mL) | 0,4-0,5 |
| Riboflavin (B2) (µg/mL) | 1,5-1,7 |
| Niacin (B3) (µg/mL) | 0,8-0,9 |
| Kobalamin (B12) (µg/mL) | 0,004-0,006 |
| Vitamin A (µg/100 mL) | 34 |
| Vitamin D (IU/g masti) | 0,41 |
| Tokoferol (E) (µg/g) | 0,06 |

Biološki aktivne materije se nalaze u mleku i utiču na rast, razvoj i imunsku funkciju novorođenčeta koje se hrani mlekom. U ove materije se ubrajaju antimikrobne materije (imunoglobulini, bioaktivni oligosaharidi, laktoperoksidaze, lizozim, laktoferin i drugi), citokini i imunoregulatori a zatim hormoni.

2.1.1. Antimikrobne materije

Imunoglobulini su značajni sastojci pre svega kolostruma a zatim i mleka krava jer prenose pasivan imunitet sa majke na novorođenčad. U kolostrumu krava su najviše zastupljeni imunoglobulini G klase (IgG) sa koncentracijom od 30 do 87 g/l, čineći oko 80 do 90 % ukupnih imunoglobulina, dok su u manjoj količini prisutni IgA, IgD, IgE i IgM (Godden i sar., 2019). Za razliku od ljudi gde imunoglobulini mogu da prođu kroz placentu, kod krava se to ne dešava pa novorođena telad moraju da se snabdevaju imunoglobulinima iz kolostruma kao jedinim izvorom ovih biološki aktivnih materija za njih. Bovini imunoglobulini mogu prevenirati vezivanje patogena za ćelije domaćina, prezentirati patogene makrofagima u cilju njihove destrukcije, stimulisati T i B imunski odgovor, modifikovati crevnu mikrofloru i indukovati lokalnu produkciju IgA (Ulfman i sar., 2018). IgG stoga mogu obezbediti pasivni imunitet i modulirati urođeni i stečeni imunski odgovor. **Bioaktivni oligosaharidi** prisutni u kolostrumu mogu delovati protiv patogena delujući kao prebiotici odnosno stimulišući rast povoljnih bakterija u lumenu creva. Dodatno, oni mogu delovati kao kompetitivni inhibitori protiv određenih bakterija tako što se vezuju na mesta vezivanja na epitelnim ćelijama jer imitiraju ugljene hidrate koji se nalaze na površini epitelnih ćelija (Godden i sar., 2019, Morrin i sar., 2019). Na primer, *in vitro* studije su pokazale da oligosaharidi mleka goveda inhibiraju adheziju *E. coli*, *Salmonella*, *C. sakazakii* i *H pylori* (Douëllou i sar., 2017). **Laktoperoksidaze** su antimikrobni glikoproteini koji pripadaju familiji enzima hem peroksidaza koji inhibiraju bakterijski metabolizam. Laktoperoksidaze

su efektivni antimikrobni faktori toksični za mnoge Gram pozitivne i Gram negativne bakterije (Seifu i sar., 2005). Deluju tako što proizvode reaktivne kiseonične radikale. Ti radikali mogu da interaguju sa određenim aminokiselinama u mikrobnim proteinima, dovodeći do inhibicije mikrobnog metabolizma i replikacije. Laktoperoksidaze se dodaju kao konzervansi u raznim proizvodima hrane, kozmetici, kao i oftamološkim i stomatološkim higijenskim proizvodima. **Lizozim** poseduju antibakterijsku aktivnost jer uzrokuje lizu ćelija Gram negativnih bakterija i inhibira rast Gram pozitivnih bakterija (Wheeler i sar., 2007; Clare i sar., 2005). **Laktoferin** ima višestruke efekte, uključujući poboljšanje resorpcije gvožđa kao i antimikrobnu aktivnost (Arnold i sar., 1980; Aisen i sar., 1980), vezivanje lipopolisaharida, imunomodulaciju i stimulisanje rasta intestinalnih epitelnih ćelija i fibroblasta (Zhao i sar., 2019). Laktoferin povećava antimikrobnu aktivnost lizozima protiv *E. coli* (Pakkanen i Aalto., 1997). Vrednost lizozima u kolostrumu ogleda se u tome što je dokazano da u slučaju ishrane dece zamenom za mleko koja ne sadrži lizozim, trostruko se povećava mogućnost pojave dijareje u odnosu na decu koja se hrane zamenom za mleko koja ima lizozim (Lönnerdal, 2003). Laktoferin je vezujući protein (80 kDa) za gvožđe koji je prisutan i u humanom i u bovinom kolostrumu, s tim da su vrednosti u bovinom kolostrumu svega 10 % vrednosti kod ljudi (Masson i Heremans, 1971; Sanchez i sar., 1988). Mnogi radovi pokazuju da laktoferin u bovinom kolostrumu može biti odgovoran za rast creva kod novorođenčadi. Davanje laktoferina teladima smanjuje mortalitet i stimuliše rast teladi (Wheeler i sar., 2007), redukuje infekciju respiratornog trakta kod novorođenih beba hranjenih na cuclu (King i sar., 2007) i smanjuje kolonizaciju *Giardia lamblia* kod dece (Ochoa i sar., 2008). Ima i imunomodulatorsku aktivnost jer je dokazano da smanjuje polenom izazvanu alergijsku reakciju disajnih puteva kod miševa kod kojih je veštački indukovana astma (Kruzel i sar., 2006). Oralno uzet laktoferin smanjuje rizik od infekcije uz dodatno preveniranje početka nekrotičnog enterokolitisa kod prevremeno rođenih beba (Pammi i sar., 2017). U tabeli 2 prikazana je zastupljenost imunoglobulina i antimikrobnih supstanci u kolostrumu krava.

Tabela 2. Koncentracija imunoglobulina i najvažnijih antimikrobnih supstanci u kolostrumu krava (Pakkanen i Aalto, 1997; Kelly i sar., 2003; Kehoe i sar., 2007; Stelwagen i sar., 2009; Pereira, 2014; Bagwe i sar., 2015; Godden i sar., 2019; Bagwe-Parab i sar., 2020)

| Imunoglobulini | Koncentracija (g/L) |
|-------------------------------|----------------------|
| IgG1 | 0,31-0,40 |
| IgG2 | 0,03-0,08 |
| IgA | 0,04-0,06 |
| IgM | 0,03-0,06 |
| Antimikrobne supstance | Koncentracija (mg/L) |
| Laktoferin | 20-75 |
| Laktoperoksidaza | 13-30 |
| Lizozim | 0,07-0,6 |

2.1.2. Citokini i imunoregulatori

Imunska odbrana organizma je rezultat urođenih i stečenih procesa. Kolostrum i mleko sadrže mnoge sastojke koji utiči na oba ova procesa. Urođeni imunski odgovor je prva linija odbrane koja štiti organizam od enteričnih infektivnih agenasa detektujući ih i eliminišući putem ćelijskih i molekularnih procesa. Ovaj urođeni odgovor se posle nastavlja kroz stečeni imunski odgovor, koji se sprovodi putem B i T ćelija. Kolostrum sadrži i specifične imunske faktore (kao što je IgG) i nespecifične modulatorne i antimikrobne faktore (kao što je laktoferin) koji imaju potencijal imunomodulacije. Postoje brojni radovi koji ukazuju da bovini kolostrum ima ulogu u prevenciji i lečenju mikrobnih infekcija (Tacket i

sar., 1992), koju ostvaruje u sadejstvu sa imunskim funkcijama domaćina (Jones i sar., 2019). Volonetri, koji su dobijali bovini kolostrum u isto vreme kada su primili oralnu *Salmonella typhi* Ty21a vakcinu, proizvodili su povećan nivo cirkulišućih specifičnih IgA u poređenju sa kontrolnom grupom koja nije dobijala bovini kolostrum (He i sar., 2001).

Citokini su peptidi odnosno proteini značajni za imunsku funkciju, ćelijsku signalizaciju, i prepoznavanje patogena. Oni nisu aktivni u održavanju normalne ćelijske homeostaze, ali se aktiviraju u vreme stresa, inflamacije ili povrede (Dinarello, 1994), kada stimulišu procese kao što je diferencijacija, hemotaksa i sinteza proteina. Oni utiču na to koji tipovi imunskih ćelija urođenog ili stečenog imuniteta će se regrutovati prilikom infekcije patogenima. Bovini kolostrum i mleko sadrže brojne citokine, uključujući TNF α i faktor stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija (eng. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, skr. GM-CSF) i interleukine (IL)1 β , IL-6, IL-10 (Wheeler i sar., 2007). Smatra se da citokini, kod novorođenčadi i dece koja konzumiraju bovini kolostrum, mogu da moduliraju imunski odgovor delujući zajedno sa unetim imunoglobulinima i nespecifičnim antibakterijskim faktorima iz bovinog kolostruma. Međutim, citokini nisu aktivni samo pri postojanju stimulisane inflamacije. Neki citokini kao IL-8, stimulišu migraciju ćelijske linije kolona (Rathe i sar., 2014), dok drugi, kao IL-10 preveniraju preterano jak inflamatorni odgovor (Saraiva i sar., 2020). Kao podrška ideji da bovini kolostrum prigušuje pojačanu imunsku reaktivnost, objavljena je studija koja je koristila ćelije karcinoma kolona (HT-29) i gde je pokazano da tretiranje sa bovinim kolostrumom suprimira IL-1 β indukovanu aktivaciju i inhibira degradaciju inhibitor proteina NF κ B (An i sar., 2009), sugerišući da bovini kolostrum može da zaštiti jedinku od intestinalne inflamacije inhibirajući NF κ B put. Slično, bovini kolostrum značajno smanjuje fitohemaglutinacijom (PHA)-indukovanu proliferaciju humanih perifernih limfocita. Iako su se ranije razmatrali odvojeno citokini i hormoni, utvrđeno je da oni imaju preklapajuće dejstvo odnosno citokin IL-8 stimuliše migraciju humanih epitelnih ćelija kolona (Wilson i sar., 1999), a to je funkcija koja se fiziološki pripisuje faktorima rasta tj hormonima. Dalje, izgleda da postoji preklapanje između citokina i faktora rasta u medijaciji njihovih aktivnosti.

Pored citokina, u mleku postoje i drugi imunoregulatori. Bovini kolostrum, pored epitelnih ćelija majke, sadrži leukocite majke, kao B i T limfocite, makrofage i neutrofile (Barrington i sar., 1997). Ovi leukociti štite telo od enteričnih patogena delujući direktno na mikroorganizme, a dodatno stimulišući lokalni imunski odgovor, kao što je produkcija citokina, IgG, i antimikrobnih faktora (Stelwagen i sar., 2009). Uobičajena purifikacija i priprema bovinog kolostruma za upotrebu kod ljudi uklanja ove ćelije iz finalnog proizvoda. Dodatno, **mikroRNA elementi** sa imunoregulatornim potencijalom su takođe prisutni u bovinom kolostrumu. Prisutni su u mikrovezikulama koje su relativno stabilne tokom pasaže kolostruma kroz gastrointestinalni trakt i mogu uticati na limfoidne ćelije unutar creva (Van Hese i sar., 2020). **Kolostrinin** (poznat kao prolinom bogat polipeptid ili PRP) je polipeptid bogat prolinom koji učestvuje u borbi protiv preterano jakog inflamatornog odgovora. Utvrđen je aminokiselinski sastav kolostrina izdvojenog iz kolostruma kod ovaca, goveda i ljudi (Kruzel i sar., 2001). Kolostrinin je stoga potpuno hemijski definisan i zna se da sadrži mešavinu od najmanje 32 peptida sa molekularnom masom od 0,5 do 3 kDa (Ratray i sar., 2005), uglavnom dobijenih iz parcijalne proteolize β kazeina. Kolostrinin reguliše produkciju citokina i može da inhibira produkciju reaktivnih kiseoničnih radikala (Zablocka i sar., 2020). Ispitivanjima koja su vršena sa spoljnim alergenima u modelu alergijske inflamacije disajnih puteva kod murine, dokazano je da kolostrinin prevenira alergijske reakcije (Boldogh i sar., 2008). Takođe, kada se imunokompromitovani pacovi koji su inficirani sa enterotoksinom *E.coli* tretirani kolostrinom, pokazali su smanjen nivo endotoksina i smanjenje inficiranih limfnih čvorova (Ragab i Ibrahim, 2004).

2.2. Hormoni prisutni u mleku krava

Hormoni su prisutni u mleku krava. Njihova koncentracija u mleku je najveća na početku laktacije, dakle u kolostrumu, nakon čega se smanjuje (Baumrucker i Blum, 1993). Većina hormona u mleku je prisutna u koncentracijama koje su više od koncentracija koji taj hormon ima u krvnoj plazmi krava. Međutim, neki od njih su prisutni u koncentracijama manjim nego u krvnoj plazmi. Kada je u pitanju poreklo hormona u mleku, neki od njih potiču iz krvne plazme i transportuju se u mleko u nepromenjenoj količini i aktivnosti. Drugo hormoni u tom prenosu bivaju modifikovani procesom glikozilacije, fosforilacije ili proteolize koja se odigrava u mlečnoj žlezdi ili mleku. Neki hormoni, kao estrogeni, insulinu sličan faktor rasta-1 (IGF-1), epidermalni faktor rasta (skr. EGF) i drugi mogu da se sintetišu unutar mlečne žlezde, pored toga što se transportuju iz krvne plazme (Grosvenor i sar., 1992).

Uloga hormona koji se izlučuju mlekom je još uvek nepoznata. Njihovo prisustvo u mleku treba posmatrati sa tri aspekta. Pre svega, to je jedan od načina na koji se hormoni koji su obavili svoju funkciju izlučuju iz organizma krave jer je mlečna žlezda ekskretorni organ za ove biološki aktivne materije. S druge strane, hormoni utiču na rast i funkciju same mlečne žlezde. Na primer, visoka koncentracija IGF-1 u mleku se dešava u periodu kasnog graviditeta kada je rast i razvoj mlečne žlezde najintenzivniji. To je dokazano u radu Šamanc i saradnika (2009a) koji su poredili koncentraciju ovog faktora rasta u mleku pre i posle teljenja krava. Takođe, održavanje i završetak laktacije, kao i involucija mlečne žlezde su pod kontrolom hormona koji se izlučuju mlekom. Konačno, hormoni prisutni u mleku krava mogu uticati na rast i razvoj tkiva novorođenčadi u periodu kada im je mleko majke jedina hrana (Kirovski, 2015). To se pre svega odnosi na razvoj imunskog sistema, creva ali i drugih tkiva kod novorođenčadi (Kirovski, 2015).

2.2.1. Insulinu sličan faktor rasta-1

Insulinu sličan faktor rasta-1 (IGF-1) goveda je polipeptid koji se sastoji od 70 aminokiselina i koji je po svojoj strukturi sličan insulinu. Između bovinog i humanog IGF-1 postoji 100% homologije. Prevedashodno se sintetiše u jetri ali se može sintetisati i u drugim tkivima u kojima ispoljava endokrini, parakini ili autokrini efekat (Fruchtman i sar. 2002). Ovaj hormon je snažan mitogeni faktor, koji izaziva ćelijski rast i proliferaciju a inhibira apoptozu (Clatici i sar., 2018). Pored toga, može imati i anaboličke efekte na metabolizam proteina i ugljenih hidrata. Kada je u pitanju uticaj na metabolizam masti, poznato je da adipociti nemaju receptore za IGF-1 a da su izuzetno bogati u receptorima za insulin. Međutim, preadipociti su bogati u receptorima za IGF-1, tako da IGF-1 ima uticaj na diferencijaciju ovih ćelija (Scavo i sar., 2004). Postoje dva tipa receptora preko kojih IGF-1 ostvaruje svoje delovanje na ćeliju. To su tip 1 i tip 2 IGF receptora, pri čemu IGF-1 ima značajno veći afinitet prema tipu 1 IGF receptora. U višim koncentracijama IGF-1 može da se veže i za insulinski receptor. Stoga, IGF-1 smanjuje koncentraciju glukoze u krvi ali je njegov efekat svega 5% onih koji insulin ima na smanjenje glikemije. U svim biološkim tečnostima, IGF-1 je gotovo u celini (95-99%) vezan za jedan od šest IGF vezujućih proteina (IGFBP-1 do -6) (Forbes i sar., 2012). Posledično, manje od 1 % IGF-1 cirkuliše u slobodnoj formi, odnosno nije vezan za IGFBP (Clemmons, 1993; Kirovski i sar. 2008; Melnik 2009), a to je oblik koji je biološki aktivan. Koncentracija IGF-1 u mleku krava značajno varira, od približno 1 ng/mL do 150 ng/mL, zavisno od faze laktacije, sastava mleka i drugih faktora sredine (Malekinejad i Rezabakhsh, 2015). Tako, najviša koncentracija IGF-1 je utvrđena odmah nakon teljenja u kolostrumu a zatim postepeno opada do nivoa od 1 do 10 ng/mL (Šamanc i sar. 2009a; Castiglieo i sar. 2011; Collier i sar., 1991). U bovinom kolostrumu koncentracija IGF-1 je 500 mg/L, dok je u humanom kolostrumu njegova koncentracija svega 18 mg/L (Baxter i sar., 1984, Vacher i sar., 1993).

2.2.2. *Insulin*

Insulin se nalazi u kolostrumu i mleku krava u količini od 37 ± 14 $\mu\text{g/l}$ odnosno $5,5 \pm 0,6$ $\mu\text{g/l}$, pojedinačno (Malven i sar. 1987). Međutim, Aranda i saradnici (1991) su u kolostrumu krava, kod prve muže, utvrdili prisustvo insulina u koncentraciji od čak 327 $\mu\text{g/l}$, da bi sa napredovanjem laktacije utvrdili smanjenje koncentracije insulina do vrednosti od 46 $\mu\text{g/l}$ koliko su registrovali sedmog dana i kasnije do kraja laktacije. Pored ispitivanja prisustva insulina u mleku i kolostrumu, mnogi autori su ispitivali i formu u kojoj se insulin nalazi u sekretu mlečne žlezde. Utvrđeno je da se insulin u kolostrumu ne nalazi u slobodnoj formi već vezan za proteine. Aranda i saradnici (1991) su dokazali da je insulin u mleku pretežno vezan za kazein.

Insulin je najznačajniji anabolički hormona koji utiče na metabolizam, pre svega, organskih jedinjenja. On pospešuje korišćenje glukoze u različitim tkivima, a pre svega mišićnom i masnom tkivu. Naime, u ovim tkivima se nalaze transporteri za glukozu zavisni od insulina, prevashodno GLUT 4, koji su smešteni u citoplazmatskim vezikulama. Kada se koncentracija insulina u krvi poveća, ovi transporteri se ugrađuju u ćelijsku membranu omogućavajući utilizaciju glukoze u samu ćeliju. Pored toga, insulin omogućava deponovanje glukoze u jetri u formi glikogena. To čini na više različitih načina. On aktivira enzim heksokinazu koja fosforiliše glukozu i tako je “zarobi” u ćeliji. Istovremeno, insulin inhibira aktivnost glukoze-6-fosfataze. Dodatno, insulin može da aktivira i nekoliko drugih enzima značajnih za sintezu glikogena. To su fosfofruktokinaza i glikogen sintetaza. Kao posledica svega ovoga, insulin izaziva pad koncentracije glukoze u krvi. Insulin ima značajan uticaj i na metabolizam masti jer utiče na sintezu masnih kiselina u jetri i sprečava lipolizu u masnom tkivu. Anabolički efekat na metabolizam proteina insulin ostvaruje tako što pospešuje preuzimanje aminokiselina od strane različitih tkiva i, posledično, sintezu proteina.

2.2.3. *Glukokortikosteroidi*

Glukokortikosteroidi (*kortizol, kortizon, kortikosteron*) se pretežno luče u kori nadbubrežne žlezde. Samo kortizol (hidrokortizon) se luči u fiziološki značajnoj količini. Inače, kod goveda se kortizol i kortikosteron luče u istim količinama, s tim da je kod novorođene teladi, do 10. dana starosti, u krvi prisutan samo kortizol. Kortizon, kao treći glukokortikosteroid, se kod svih sisara luči u malim količinama. Kortikosteroidi se u cirkulaciji transportuju vezani za proteine. Više od 90 % kortizola je vezano za alfa globulin nazvan *transkortin* (eng. *cortisol binding globulin*, skr. CBG), kao specifični nosač. Transkortin se sintetiše u jetri. Znatno manji deo kortizola, u odnosu na deo vezan za transkortin, je nespecifično vezan za albumine. Kortikosteron se slično vezuje ali u manjem obimu. Forma hormona vezana za proteine je izvor slobodnog hormona pri čemu je odnos vezanog i slobodnog hormona takav da je u cirkulaciji znatno više prisutna vezana forma hormona. Međutim, samo slobodna forma hormona je biološki aktivna. Glukokortikosteroidi ostvaruju metaboličko, ali i antizapaljensko, antialergijsko i imunosupresivno delovanje. Oni utiču na metabolizam pre svega glukoze odnosno ugljenih hidrata, ali i masti i proteina, kao i delom vode i mineralnih materija. Uticaj na metabolizam ugljenih hidrata ostvaruje se prevashodno u stanju stresa, kada se koncentracija glukokortikosteroida značajno povećava, dok u fiziološkim uslovima, glukokortikosteroidi ne utiču na metaboličke procese. Na metabolizam ugljenih hidrata deluju prevashodno tako da dovode do porasta koncentracije glukoze u krvi, stimulišući glukoneogenezu u jetri. Uticaj na metabolizam masti ogleđa se u lipolitičkom delovanju glukokortikosteroida čime se povećava koncentracija slobodnih masnih kiselina i glicerola u krvnoj plazmi. Uticaj na metabolizam proteina ogleđa se u kataboličkom delovanju na metabolizam proteina u mišićima, koži, limfoidnom i vezivnom tkivu čime se povećava dostupnost aminokiselina za proces glukoneogeneze. Glukokortikosteroidi su hormoni mleka koji sa drugim hormonima utiču na proces laktogeneze. Kortizol je dominantni glukokortikosteroid koji se preuzima iz krvi od strane

mlečne žlezde (Schwalm i Tucker, 1978; Gorewit and Tucker, 1976). Prema podacima Schwalm i saradnika (1978) fiziološka koncentracija ukupnih glukokortikosteroida je od 0,46 do 0,65 ng/mL, dok radovi Alexandrova i Machoa (1983) ukazuju da je ta koncentracija od 8 do 18 ng/mL. To je vrlo niska koncentracija kada se poredi sa koncentracijama utvrđenim u mleku žena (20 do 136 ng/mL) i pacova (144 ng/mL) (Alexandrova i Macho, 1983). Glukokortikosteroidi se uglavnom nalaze u nelipidnoj frakciji mleka (Schams i Karg, 1986). Utvrđeno je da zbog široke primene deksametazona kao sintetskog glukokortikosteroida u veterinarskoj medicini u terapiji metaboličkih bolesti, kao i inflamatornih bolesti kod drugih životinja, sadržaj rezidua u mleku i drugim tkivima može da raste (Cherlet i sar., 2004). Utvrđeno je da nakon terapanja Holštajn krava sa ACTH, koncentracija kortizola u mleku raste četverostruko i taj je porast bio posledica stabilnog porasta koncentracije kortizola u krvi (Fox i sar., 1981). Istovremeno, stresne situacije kao transport, neurološke bolesti, promene u ishrani, promene u sredini kao promene temperature i stotine drugih izazivača stresa može da podigne nivo glukokortikosteroida u mleku. Uprkos napretku u detekciji i kvantifikaciju glukokortikosteroida u mleku, postoji nedostatak znanja o mogućoj resorpciji i posledično biološkim efektima glukokortikosteroida mleka kod ljudi i životinja.

2.2.4. Tireoidni hormoni

Tireoidna žlezda normalno luči jodirane derivate aminokiselina. To su, pre svega, tiroksin (T_4) a zatim i manje količine drugih tironina, kao što je 3,5,3` trijodtironon (T_3). U perifernim tkivima T_4 se konvertuje u različite proizvode uključujući T_3 (Chopra i sar., 1975) i reverzni trijodtironin (rT_3), koji je metabolički neaktivan. Tireoidni hormoni utiču na sazrevanje, rast i metabolizam. Tireoidni hormoni su galaktopoetički i mogu imati značajnu ulogu u regulaciji laktacije (Cowie i sar., 1980). Uloga tireoidnih hormona u mleku nije potpuno poznata. S druge strane, poznato je da je uloga tireoidnih hormona u organizmu višestruka. Oni utiču na veliki broj ciljnih ćelija stimulišući utilizaciju kiseonika i proizvodnju toplote. To doprinosi intenziviranju bazalnog metabolizma, povećanoj dostupnosti glukoze ćelijama, stimulaciji sinteze proteina, stimulaciji srčane i neurološke funkcije (Capen i Martin, 1989). Tireoidni hormoni utiču i na ćelijsku diferencijaciju. Značajni su stimulatori termogeneze zbog čega imaju značajan uticaj na održavanje telesne temperature (Silva, 2005). Koncentracija tireoidnih hormona u krvi je značajno manja od one u mleku. Koncentracija slobodnog tiroksina u krvi kreće se u rasponu od 1,37 do 1,86 ng/dL, dok se koncentracija slobodnog trijodtiroksina kreće u rasponu od 2,98 do 6,23 pg/mL (Nixon i sar., 1988). Koncentracija tiroksina u mleku krava se kreće u rasponu od 50 do 62 ng/dL, dok je koncentracija trijodtironina u mleku u rasponu od 210 do 320 pg/mL (Akasha i sar., 1987). Sa metodološkog aspekta je značajno naglasiti da ove hormone nije moguće meriti procedurama ekstrakcije posle koje se radi radioimunoesej (Akasha i Anderson, 1984).

2.2.5. Progesteron

Progesteron proizvodi žuto telo jajnika, placenta i kora nadbubrega. On je jedan od esencijalnih hormona u reprodukciji, jer utiče na sve procese od ovulacije do održavanja trudnoće, utiče na razvoj mlečne žlezde ali i na neurobihevijarne procese udružene sa seksualnim odgovorom (Zalanyi, 2001). Lučenje progesterona u žutom telu kontroliše luteinizirajući hormon (LH) kod negravidnih životinja. Transportuje se vezan za specifične nosače, globuline. Tako, kortizol vezujući protein (koji ima visok afinitet za kortizol i kortikosteron) vezuje i progesteron. Albumini nespecifično vezuju progesteron.

Uloge progesterona su da promovise rast žlezda endometrijuma, izaziva lobuloalveolarni rast u mlečnoj žlezdi, promovise sekretornu aktivnost ovidukta i endometrijalnih žlezda, reguliše sekreciju gonadotropina. Progesteron iz preovulatornog folikula ili žutog tela je potreban za ispoljavanje

seksualne prijemčivosti, odnosno ispoljavanje estrusnog ciklusa. Delovanje progesterona je često u sadejstvu sa estrogenom i zahteva inicijalno dejstvo estrogena. Proizvodnja progesterona opada tokom 36 sati od početka luteolize. Metaboliše se u jetri konjugacijom sa glukuronskom kiselinom ili sulfatima. Pored navedene centralne uloge u reproduktivnom sistemu, progesteron pokazuje neke druge efekte uključujući imunosupresivni efekat tokom trudnoće, porast nivoa mijelin-specifičnog proteina i slično (Miller i Hunt, 1996; Jung-Testas i sar., 1999). Progesteron je ustanovljen i izmeren u mleku različitih vrsta životinja ali prvi put kod krava i zbog svojih karakteristika nepolarnog molekula distribuiran je unutar masne frakcije mleka (Gunzler i sar., 1975). Zbog svog prisustva u mleku, koncentracija progesterona se koristi kao dijagnostička alatka za potvrdu graviditeta u veterinarskoj medicini (Hoffmann i sar., 1977). Fiziološka koncentracija progesterona u mleku krava je različita u različitim reproduktivnim fazama estrusnog ciklusa, tako da 21. dana ciklusa, sredini ciklusa, krajem ciklusa i tokom graviditeta iznosi 5,42, 11,36, 8,53 i 11,75 ng/mL, pojedinačno (Rioux i Rajotte, 2004). Izmerena koncentracija progesterona u hrani dobijenoj preradom mleka iznosi 17, 98, 43 i 300 ng/mL u obranom mleku, mleku u prahu, šlagu i puteru, pojedinačno. Ove vrednosti potvrđuju visoku liposolubilnost progesterona (Hoffmann i sar., 1975). Rezultati takođe pokazuju da se progesteron prenosi iz krvi u mleko transcelularno, jednostavnom i olakšanom difuzijom (Heap i sar., 1986).

2.2.6. Estrogeni

Kod životinja koje nisu gravidne, najznačajniji estrogen je estradiol - 17 β , dok je kod gravidnih životinja to estron. Estrogeni se proizvode u granulosa ćelijama folikula jajnika, fetoplacentalnom tkivu i kori nadbubrega. Ovarijalni estrogeni se sintetiše pod uticajem folikulosimulirajućeg hormona (FSH) koji ima uticaj na granulosa ćelije. LH ima isto tako značajnu ulogu u sintezi estrogena, jer vrši kontrolu sinteze esencijalnog prekursorskog molekula, testosterona, od strane ćelija teka interne.

U krvnoj plazmi estrogeni se transportuju vezani za nosače. Ti nosači mogu biti specifični, odnosno globulini, kao što je protein koji vezuje estrogen visokim afinitetom ali niskim kapacitetom (eng. *sex hormone binding globuline*; skr. *SHBG*) i nespecifični, odnosno albumini, koji estrogen vezuju niskim afinitetom i visokim kapacitetom. Više od 95% estrogena je vezano za proteine a ostatak je slobodan odnosno biološki aktivan.

Uloge estrogena su da stimuliše rast endometrijalnih žlezda kao i razvoj kanalića u mlečnoj žlezdi, da uzrokuje sekretornu aktivnost ovidukta, povećava seksualnu prijemčivost s tim da je za ovo njegovo delovanje potrebno i sadejstvo progesterona. Estrogen takođe reguliše sekreciju gonadotropina, uključujući preovulatorno oslobađanje LH iz adenohipofize. Dodatno, estrogeni je značajan za oslobađanje PgF₂ α iz negravidnog i gravidnog uterusa na porođaju, a koji dovodi do regresije žutog tela, zaustavlja rast dugih kostiju jer izaziva zatvaranje epifizne ploče rasta, stimuliše anabolizam proteina i deluje epiteliotropno.

Sinteza estrogena od strane granulosa ćelija raste tokom faze rasta folikula, a zatim, 24 sata nakon preovulatornog pika LH, naglo pada.

Estrogen se metaboliše u jetri konjugovanjem sa glukuronskom kiselinom ili sulfatima čineći ga rastvorljivim u vodi, žuči i urinu. Steroidi se metaboličkim putem često razlažu na komponente koje imaju značajno smanjenu ili promenjenu biološku aktivnost. Tako, kod primata, estradiol 17 β može da se konvertuje u estron. Ovaj proces se odvija u jetri ali i perifernim tkivima. Kod žena glavni deo estrona upravo potiče iz različitih tkiva a mnogo manji iz jajnika.

Prisustvo estrogena u mleku krava je fiziološka pojava, ali je njihova koncentracija u mleku varijabilna (Malekinejad i Rezabakhsh, 2015). Ovi hormoni su uvek prisutni u mleku zbog svoje steroidne strukture koja im daje liposolubilnost i mogućnost difuzije kroz krvno-mlečnu barijeru, što

ukazuje na činjenicu da je prisustvo estrogena u mleku u direktnoj korelaciji sa njihovom koncentracijom u krvi (Snoj i Majdič, 2018a).

Do danas je, u mleku krava, otkriveno prisustvo estron sulfata (E1), 17 α -estradiola (α E2), 17 β -estradiola (β E2) i estriola, kako u slobodnom (nekonjugovanom), tako i u vezanom (konjugovanom) obliku u kome nabrojani estrogeni grade jedinjenja sa sumpornom (sulfati) ili glukuronskom (glukuronidi) kiselinom (Malekinejad i sar. 2006). Pri tome, poznato je da su u mleku najzastupljeniji konjugovani oblici estrogena koji imaju mnogostruko manju biološku aktivnost u poređenju sa nekonjugovanim oblicima, ili je čak uopšte nemaju (Gadd i sar. 2010; Parodi 2012), što samo delimično smanjuje opasnost od njihovog prisustva u mleku. Naime, u crevima ljudi postoje uslovi za dekonjugaciju estrogena jer raznolika mikroflora creva raspolaže *glukuronidazama* i *sulfatazama*, enzimima koji oslobađaju estrogene iz jedinjenja sa glukuronskom ili sumpornom kiselinom, čime omogućavaju njihovu resorpciju u slobodnom, biološki aktivnom obliku (Parodi, 2012).

Osim toga, važno je napomenuti da razlike u biološkoj aktivnosti ne postoje samo između različitih oblika estrogena, već i između različitih vrsta estrogena prisutnih u mleku krava. Tako, najveću biološku aktivnost ima 17 β -estradiol koji je, istovremeno, najmanje zastupljen u mleku krava. On se, kao i ostali estrogeni, sekretuje od strane jajnika, ali i nadbubrežne žlezde i testisa. On utiče na mnoge reproduktivne funkcije. Sa druge strane, estron kao oblik estrogena koji je najzastupljeniji u mleku krava, ima višestruko manju biološku aktivnost u odnosu na 17 β -estradiol, što je značajno sa aspekta zdravlja konzumenata mleka (Malekinejad i Reزابakhsh 2015; Snaj i Majdič 2018).

2.2.7. Faktori koji utiču na sadržaj hormona u mleku

Na sastav mleka krava, a time i sadržaj hormona u njemu, utiče značajan broj faktora koji su povezani ili za samu životinju ili za okruženje u kome se ona nalazi. Tako ishrana (Ferlay i sar., 2008; Larsen i sar., 2010), rasa (Soyeurt i sar., 2006; Palladino i sar., 2010), genetika (Soyeurt i sar., 2008), faza laktacije (Craninx i sar., 2008; Stoop i sar., 2009), menadžment (Coppa i sar., 2013) i sezona (Heck i sar., 2009), kao i njihova međusobna interakcija (Macdonald i sar., 2008; Piccand i sar., 2013; Stergiadis i sar., 2013), utiču na sastav mleka. Delovanje ovih faktora uključuje mnoge fiziološke mehanizme koji nisu u potpunosti razjašnjeni. Kada su u pitanju estron, α E2 i β E2, utvrđeno je da na njihovu koncentraciju u mleku utiče prevashodno faza gestacije. Takođe, sadržaj estrogena u mleku varira zavisno od procenta masti u mleku, a razlog ovome je što su ovi hormoni lipofilni (Pape-Zambito i sar., 2010). Koncentracija progesterona u mleku je smanjena kod krava koje se hrane visokim nivoima koncentrata i moguće objašnjenje za ovo smanjenje je porast metaboličkog klirensa progesterona koji je udružen sa porastom unosa energije. Nađeno je da je kumulativna koncentracija progesterona u mleku krava tokom treće lutealne faze postpartalno bila viša kod krava sa manjom mlečnošću (Reksen i sar., 2002). Uticaj faze laktacije na koncentraciju tireoidnih hormona je različito prikazan u različitim studijama. Tako, Hart i saradnici (1978) nisu našli razliku u koncentraciji T₄ sa promenom faze laktacije ali Plaut i saradnici (1985) su našli značajne razlike. Oni su utvrdili da je koncentracija T₄ u krvnom serumu bila niža u početku laktacije u odnosu na kasnije faze.

2.3. Hormoni prisutni u mleku krava kao potencijalni rizik za zdravlje ljudi

Mleko i proizvodi od mleka krava se dugo koriste u ishrani ljudi. Potrošnja mlečnih proizvoda je različita u različitim regionima sveta tako da je ona najviša na Islandu i Finskoj gde iznosi 180 kg mleka i mlečnih proizvoda po osobi godišnje a najniža u Kini i Japanu gde iznosi svega 50 kg godišnje po osobi (Saxelin i sar., 2003). U zapadnim društvima konzumacija mleka se značajno smanjuje tokom poslednjih decenija. Taj trend je delimično posledica tvrdnji da mlečni proizvodi negativno utiču na zdravlje ljudi. To se posebno odnosi na činjenicu da mlečna mast sadrži visok nivo zasićenih masnih

kiselina, za koje se pretpostavlja da doprinose pojavi srčanih bolesti, porastu telesne mase i gojaznosti (Insel i sar., 2004). Međutim, poslednjih godina se sve više radova bavi potencijalno negativnim uticajem hormona prisutnih u mleku na zdravlje ljudi (Melnik i sar., 2023). Najviše radova je posvećeno uticaju estrogena i progesterona prisutnih u mleku krava na zdravlje ljudi, zatim uticaju IGF-1 i tireoidnih hormona, dok nedostaju literaturni podaci vezani za uticaj insulina i glukokortikosteroida u mleku krava na zdravlje ljudi.

Još od 1929. godine, kada je japanski naučnik Yaida izvestio naučnu javnost o prisustvu **hormona jajnika** u kravljem mleku, izučavanje biološkog značaja i eventualnog uticaja ovih hormona na zdravlje ljudi se, sve do danas, razvijalo u najmanje tri pravca. Prvi pravac obuhvata merenje, odnosno kvantifikaciju prisustva ne samo hormona jajnika nego i ostalih hormona i drugih biološki aktivnih materija u mleku krava (Jouan i sar. 2006; Nedić i sar., 2017) i uticaja različitih faktora na njihovu zastupljenost (Trifković i sar., 2018; Trifković i sar., 2021). Sledeći pravac je praćen razvojem analitičkih metoda i tehnika koje su se koristile u određivanju koncentracije hormona jajnika u mleku krava, a svoj vrhunac je dostigao krajem sedamdesetih godina prošlog veka (Ginther i sar. 1974; Monk i sar. 1975; Wolford i Argoudelis 1979). Tokom ovih godina, ne samo da je zabeležen značajan uspeh u razvoju analitičkih metoda, već je došlo i do prepoznavanja dijagnostičke vrednosti hormona jajnika u mleku krava, naročito u pogledu dijagnostike graviditeta na osnovu koncentracije progesterona, ali i procene funkcije *de Grafovog* folikula na osnovu koncentracije estrogena (Heap i sar. 1976; Koldovský 1995). Konačno, poslednji pravac razmatra prisustvo **estrogena** u mleku krava kao potencijalnog rizik za zdravlje ljudi i time je smešten u kontekst javnog zdravlja (Snoj i Majdič 2018). Osnova za takvu kvalifikaciju estrogena kravljeg mleka, nalazi se u izveštajima brojnih studija koje pojavu hormonski zavisnih tumora, poput raka dojke, jajnika, materice, testisa i prostate u populaciji ljudi, dovode u vezu sa povišenom koncentracijom estrogena u krvi (Parodi, 2012). Budući da je struktura bovinih i humanih estrogena identična, pretpostavljeno je da dugoročni unos estrogena putem namirnica životinjskog porekla (tzv. *egzogenih estrogena*) može narušiti ravnotežu ovih hormona u organizmu ljudi (tzv. *endogenih estrogena*) i, tim putem, podstaći ili doprineti razvoju hormonski zavisnih tumora (Bronowicka-Kłys i sar. 2016). U tom pogledu, mleko se istaklo kao potencijalno rizična namirnica, jer je procenjeno da se konzumacijom mleka, na dnevnom nivou, unosi preko 70 % ukupne količine egzogenih estrogena (Malekinejad i Rezabakhsh, 2015). U poslednje dve decenije, ispitivanje povezanosti visokog nivoa estrogena u krvi sa rizikom za pojavu hormonski zavisnih tumora u populaciji ljudi, bilo je predmet brojnih studija, čije sprovođenje u praksi nailazi na svojevrstne poteškoće. Naime, ovakva istraživanja zahtevaju prospektivan pristup koji podrazumeva, prvobitno, otkrivanje ljudi sa višim koncentracijama estrogena u krvi i dalje praćenje njihovog zdravstvenog stanja, sve do eventualnog (ranog) postavljanja dijagnoze karcinoma. Ovakav pristup proističe iz činjenice da su pojedini karcinomi endokrinološki aktivni, a to znači da mogu proizvoditi i oslobađati estrogene, koji doprinose ukupnoj koncentraciji estrogena u krvi ljudi, čime je sprovođenje istraživanja nakon postavljanja dijagnoze karcinoma kompromitovano (Parodi, 2012). Dosadašnje prospektivne studije, sprovedene su od strane kako pojedinačnih istraživačkih grupa (Lukanova i sar. 2004; Eliassen i Hankinson 2008), tako i brojnih zdravstvenih organizacija, poput Međunarodne agencije za istraživanje karcinoma (eng. *IARC, World Health Organization*) i Kancelarije za epidemiologiju karcinoma (eng. *CEU, University of Oxford*). Rezultati njihovih studija se, najvećim delom, poklapaju i ukazuju da su žene sa višim nivoom cirkulišućih estrogena u postmenopauzi pod dvostruko većim rizikom za razvoj karcinoma dojke, a slični podaci se vezuju i za pojavu karcinoma materice (cerviksa) (Bronowicka-Kłys i sar. 2016). Suprotno tome, nije utvrđena veza između povišenih koncentracija estrogena u krvi žena u pre- i postmenopauzi i pojave karcinoma jajnika. Takođe, nivo estrogena u krvi

ne utiče ni na pojavu karcinoma prostate, ali ostaje otvoreno pitanje da li estrogeni, u sadejstvu sa androgenima, ipak mogu ostvariti takav uticaj kod muškaraca (Parodi, 2012).

Uobičajena hipoteza, kojom se opisuje pokretanje karcinogeneze od strane cirkulišućih estrogena, podrazumeva njihovu pasivnu difuziju kroz plazmalemu ciljnih ćelija i vezivanje za specifične estrogen receptore (ER) na jedru, koji se javljaju u dve forme, ER α i ER β . Vezivanje estrogena za specifične receptore stimuliše transkripciju gena uključenih u proliferaciju ćelija, što je jedan od ključnih momenata u karcinogenezi. Naime, intenzivnom stimulacijom proliferacije ćelija od strane estrogena, stvaraju se uslovi za nastanak grešaka prilikom replikacije DNK koje, ukoliko ne budu ispravljene, mogu biti osnova maligne transformacije ćelije i nastanka karcinoma. Dodatno, postoje podaci da estrogeni mogu stimulisati i proliferaciju ćelija koje su razvile mutacije pod uticajem drugih faktora (Parodi 2012; Bronowicka-Kłys i sar. 2016; Snoj i sar. 2018).

Razvoj industrije mleka u proteklih stotinu godina ne beleži samo povećanje mlečnosti, nego i postepeno produžavanje perioda u kome se gravidne krave muzu, a sve zbog rastućih potreba tržišta za mlekom i proizvodima od mleka (Snoj i Majdič 2018). Kako je napredovanje graviditeta kod krava praćeno sve obimnijom proizvodnjom estrogena od strane posteljice (Malekinejad i sar. 2006), postoje procene da je upravo produženi period muže, zabeležen u proteklih sto godina, odgovoran za veći nivo estrogena u mleku krava i češću pojavu hormonski zavisnih tumora kod ljudi (Parodi, 2012). Međutim, postavlja se pitanje da li su ovakve procene realne jer ne uzimaju u obzir činjenicu da je u proteklih stotinu godina, takođe, zabeleženo i povećanje mlečnosti koja je, prema Pape-Zambito i saradnicima (2008), u obrnutoj srazmeri sa koncentracijom estrogena u mleku. Bez obzira na moguće nedostatke pomenute procene, potrebno je otvoriti i razraditi pitanje uticaja visokih koncentracija estrogena u mleku gravidnih krava na zdravlje ljudi. Naime, poznato je da se na farmama visokomlečnih krava, istovremeno sa kravama u poslednjem trimestru graviditeta, na muži nalaze i krave koje su u ranijim fazama graviditeta ili nisu uopšte gravidne i koje imaju značajno niže koncentracije estrogena u mleku (Malekinejad i sar. 2006). Pri tome, do konzumenata ne dolazi mleko sa jedne farme, već mleko sa većeg broja farmi koje se u mlekarama objedinjeno obrađuje i, nakon toga, pakuje u odgovarajuće ambalaže u kojima dospeva na tržište. Zbog toga se može pretpostaviti da bi, sa aspekta zdravlja ljudi, značajnije bilo odrediti koncentraciju estrogena u kravljem mleku koje se nalazi na tržištu i dostupno je potrošačima. U tom pogledu, rezultati Farlow i saradnika (2012) su ohrabrujući, jer su koncentracije nekonjugovanog oblika estrona i 17 β -estradiola, koje su oni izmerili u punomasnom kravljem mleku, iznosile 14,45 pg/mL i 5,84 pg/mL. Ove vrednosti su između 4 i 8 puta manje od onih koje su Malekinejad i saradnici (2006) dobili za koncentraciju estrona i 17 β -estradiola u mleku krava u trećem trimestru graviditeta.

Sa druge strane, pitanje je i kakav bi efekat na zdravlje ljudi ostvarila eventualna konzumacija mleka poreklom od krava u trećem trimestru graviditeta, u kome se očekuju najviše koncentracije estrogena. U tom kontekstu, značajni su rezultati koje su Grgurevic i saradnici (2016) dobili na BALB/c miševima kao eksperimentalnom modelu. Oni ukazuju da mleko dobijeno od krava u trećem trimestru graviditeta sa koncentracijama nekonjugovanog estrona i 17 β -estradiola od 97 pg/mL i 65 pg/mL, ne utiče na nivo ova dva hormona i testosterona u krvi, kao ni na težinu materičnih rogova, testisa i semenih kesica miševa. Efekti na pomenute parametre izostali su i prilikom napajanja miševa mlekom kome su dodate stotinu puta veće koncentracije estrona i 17 β -estradiola. Izostanak efekta, u oba slučaja, objašnjava niska biološka raspoloživost estrona i 17 β -estradiola, koja se kreće između 2 i 5 % (Parodi, 2012). Ovo znači da se od ukupne količine estrogena, unetih oralnim putem, svega 2 do 5 % nađe u sistemskoj cirkulaciji u izvornom obliku, što je nedovoljno da bi isti postigli značajan efekat na nivo hormona u krvi i reproduktivne organe miševa (Grgurevic i sar., 2016).

Osim iz rezultata Grgurevic i saradnika (2016), dokazi da unos estrogena putem kravljeg mleka ne predstavlja rizik za zdravlje ljudi dolaze i od Američke agencije za hranu i lekove. Prema izveštajima ove organizacije, egzogeni estrogene ne izazivaju fiziološke efekte u organizmu ljudi ukoliko njihov svakodnevni unos ne prelazi 1 % količine dnevno proizvedenih endogenih estrogena. S obzirom da devojčice u prepubertalnoj dobi proizvode najmanju količinu estrogena, odlučeno je da se 1 % računa u odnosu na količinu estrogena koju one dnevno proizvedu, a to je 54 000 ng. Jedan procenat ove vrednosti iznosi 540 ng ili 540 000 pg, što je količina estrogena koju je gotovo nemoguće uneti putem mleka krava. Na ovo upućuju rezultati dosadašnjih studija (Malekinejad i sar. 2006; Pape-Zambito i sar. 2008; Farlow i sar. 2012) koji ukazuju da su koncentracije dva, sa aspekta zdravlja ljudi, najznačajnija estrogene nedovoljne da bi se dostigao prag od 1 %, odnosno 540 000 pg endogene proizvodnje estrogene.

Kada je u pitanju *progesteron*, poznato je da se progesteron metaboliše pomoću citohroma CYP 450s (CYP 3A, CYP2D6) kod ljudi. Ipak, učešće hidroksisteroid dehidrogenaze, u biotransformaciji progesterona je takođe pokazano. Najznačajniji i biološki aktivni metaboliti progesterona su 20 α -dihidroprogesteron, 5 α -dihidroprogesteron i 3 α -hidroksi-4 pregnen-20-one, koji pokazuje različite efekte. Ranije studije pokazuju da nakon oralne administracije progesterona kod ljudi, koncentracija progesterona u cirkulaciji i aktivnog metabolita (20 α -dihidroprogesteron) raste. Čak šta više, pokazano je da ovaj porast može da pokaže progesteronski odgovor u pojedinim tkivima. Ipak, druge studije pokazuju da zbog brze resorpcije posle oralne administracije (kao i prilikom konzumacije mlečnih proizvoda) i ekstenzivnog efekta zbog hepatične biotransformacije, oralna biodostupnost egzogenog progesterona je manja od 10 %. U literaturi nema dovoljno podataka koji se odnose na kinetiku progesterona i njegovih potencijalno aktivnih metabolita kod ljudi nakon konzumacije mlečnih proizvoda a posebno masne hrane (putera, na primer) koji sadrže visok sadržaj progesterona.

Postoji nekoliko razloga zbog kojih je prisustvo *IGF-1* u mleku krava izvor mogućih problema vezanih za zdravlje ljudi. Naime, s jedne strane poznato je da se IGF-1 razlaže u prisustvu pepsina, tripsina, himotripsina i karboksipeptidaze A (Shen i Xu, 2000), kao i da se u određenoj meri razlaže u crevnoj tečnosti (Shen i Xu, 2000). Međutim, kada su molekuli IGF-1 zajedno sa mlekom inkubirani u želudačnoj tečnosti pacova i svinja molekul je ostao intaktan (Shen i Xu, 2000; Philipps i sar., 1995; Xian i sar., 1995). To je navelo na zaključak da mleko štiti IGF-1 od razgradnje u želudcu i/ili crevima (Shen i Xu, 2000, Philipps i sar., 1995; Xian i sar., 1995). Molekul IGF-1 je otporan na delovanje kiseline i visokih temperatura, što je razlog da ostaje intaktan tokom prolaska kroz želudac (Lowe, 1991). Dakle, kako je utvrdio Melnik (2009), varenje IGF-1 unetog putem mleka krava je prevenirano zahvaljujući proteinima mleka, koji potencijalno omogućavaju njegovu intestinalnu resorpciju. Stoga, prema navodu istog autora, povećana konzumacija mleka vodi ka porastu koncentracije IGF-1 u cirkulaciji dece za 20-30%, odnosno za 10-20% kod odraslih ljudi. Treba napomenuti da homogenizacija i pasterizacija značajno ne smanjuju sadržaj i aktivnost IGF-1 u mleku krava (Collier i sar. 1991). Forma IGF-1 kojoj je odsečen N terminalni kraj (-3N:IGF-1), odnosno kojoj nedostaje tripeptid Gly-Pro-Glu, je identifikovana u značajnoj koncentraciji u kolostrumu krava (Francis i sar., 1988). Ova forma IGF-1 pokazuje visok stepen bioraspoloživosti, verovatno zbog toga što pokazuje smanjen afinitet prema IGFBP u cirkulaciji (Ross i sar., 1989). IGF-1 u bovinom kolostrumu postoji u slobodnoj i vezanoj formi. Koncentracija slobodne forme varira tokom perinatalnog perioda, ali je većina IGF-1 u bovinom kolostrumu prisutna u slobodnoj formi, dok je u antepartalnom periodu i u bovinom mleku prisutan uglavnom u vezanoj formi (Schams i sar., 1991). Šest IGFBP je identifikovano i jedna od njihovih funkcija je da budu nosači, ograničavajući proteolizu IGFA tokom njegovog prolaska kroz crevo. Značajno je da modulacija IGF-1 aktivnosti može biti posredovana promenama u relativnom procentu IGF molekula prisutnih u vezanom obliku jer proliferativnu

aktivnost pokazuje samo slobodna forma IGF-1. Neke studije pokazuju da postoji unakrsna aktivnost između mikrobioma i nivoa IGF u cirkulaciji (Yan i Charles, 2018).

Visoka koncentracija IGF-1 u bovinom kolostrumu sugerise da on može biti značajan u posredovanju lokalnog crevnog anabolično-reparativnog procesa. Ipak postoje debate, u odnosu na to da li se IGF-1 iz bovinog kolostruma resporbuje intaktan, povećavajući zabrinutost da može povećati rizik od kancera prostate, zato što kancerogene ćelije prostate mogu eksprimirati receptopre za IGF-1. Ipak, patofiziološka situacija je mnogo komplikovanija, zato što administracija IGF-1 nekancerogenim ćelijama prostate povećava njihovu diferencijaciju (Heidegger i sar., 2012). Tako studije gde su osobe primale visoke doze bovinog kolostruma (40 grama dnevno nekoliko meseci) nisu pokazale značajan porast IGF-1 u krvnoj plazmi (Davison sar., 2020).

IGF-1 je visoko konzerviran molekul koji se, po svojoj strukturi, minimalno razlikuje između vrsta, a zbog čega bovini IGF-1 može da se veže sa istim afinitetom kao i humani IGF-1 za IGF receptore u humanim tkivima, dostižući iste biološke efekte (Renaville i sar. 2002; Melnik, 2009).

U naučnoj literaturi postoje podaci i o pozitivnim i negativnim efektima IGF-1 na zdravlje ljudi. Tako se poslednjih godina u naučnoj literaturi značajno mesto pridaje ulozi IGF-1, ali i hormona rasta i insulinske osovine u regulaciji dugovečnosti kod ljudi. Međutim, analizom svih tih radova može se zaključiti da postoji izvesna kontroverza (Vitale i sar. 2017). Dok jedni autori ukazuju na pozitivan efekat IGF-1 na dugovečnost (Paolisso i sar., 1997), drugi ukazuju da IGF-1 upravo ima značajnu ulogu u patogenezi nekih bolesti povezanih sa starenjem, uključujući tumore, demenciju, kardiovaskularne i metaboličke bolesti (Bartke i Darcy, 2017). Međutim, drugi autori su ukazali na protektivan efekat IGF-1 na Alzheimer-ovu bolest (O'Neill i sar. 2012) i na sve vidove demencije, uključujući demenciju tokom Parkinsonove bolesti (Westwood i sar. 2014). Dalje, Ungvari i Csiszar (2012) su ukazali da niske koncentracije IGF-1 u cirkulaciji povećavaju rizik od kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti kod ljudi. Prema Conti-ju i saradnicima (2001), niska koncentracija IGF-1 u ranoj fazi akutnog miokardijalnog infarkta predstavlja loš prognostički znak. U petnaestogodišnjoj studiji koja je obuhvatala preko 600 ispitanika utvrđeno je da osobe sa niskom koncentracijom IGF-1 u krvi imaju dvostruko veći rizik od pojave ishemijske bolesti srca (eng. *ischemic heart disease*, skr. IHD) u odnosu na zdrave osobe. Pretpostavlja se da je niska koncentracija IGF-1 u krvi u pozitivnoj korelaciji sa gojaznošću i smanjenom fizičkom aktivnošću (Laughlin i sar. 2004). Soerensen i saradnici (2014) su uočili povezanost veće konzumacije mleka i nižeg telesnog indeksa (eng. *body mass index*, skr. BMI), a što su pripisali uticaju IGF-1 iz mleka. Postoji i značajan broj radova koji ukazuje da IGF-1 ima pozitivan efekat na zdravlje kostiju, pa se smatra da kliničko određivanje IGF-1 može biti korisno u proceni rizika od frakture kostiju (Lombardi i sar. 2005; Locatelli i Bianchi 2014). Kod ljudi nisu uspeli pokušaji da se korišćenjem IGF-1 poveća mišićna masa, pogotovo u pokušajima koji su podrazumevali spečavanje gubitka mišićne mase kod starijih osoba aplikacijom IGF-1 (Taaffe 1996). IGF-1 je razmatran kao doping sredstvo u sportu, zbog njegovog stimulativnog efekta na rast mišića i reparaciju tkiva. Sintetski IGF-1 je korišćen u terapiji zastoja u rastu (Fintini, 2009)

Najviše radova u literaturi, kada je u pitanju povezanost IGF-1 i zdravlja ljudi, se odnosi na pozitivnu korelaciju utvrđenu između visoke koncentracije IGF-1 u krvi i povećanog rizika od različitih oblika kancera kod ljudi. U tom kontestu, pluća, prostata i kolono-rektalni kanceri su najčešće izveštavani u literaturi (Sutariya i sar., 2018). Tate i saradnici (2011) ukazuju da pacijenti sa kancerom prostate ili pluća treba da budu informisani o potencijalnom negativnom uticaju proizvoda od mleka na njihovo zdravlje, upravo zbog mogućeg uticaja IGF-1 iz mleka na razvoj ovih kancera. Tako je objavljeno da postoji veoma značajnu pozitivnu korelaciju između koncentracije IGF-1 u krvi i tumora dojke. U slučaju povećanja nivoa IGF-1 za 28%, kod žena je značajno povećan rizik od ovog tumora.

Slično, ukazuje se na pozitivnu korelaciju između povišenog nivoa IGF-1 u krvi i tumora prostate. Naime, rizik za razvoj ovog oboljenja je za 38% veći kod muškaraca sa značajnim povećanjem nivoa IGF-1 u odnosu na one koji imaju jako niske koncentracije ovog hormona u cirkulaciji. Meta-analiza o uticaju IGF-1 na pojavu tumora pluća nije pokazala povezanost (Chen i sar. 2009), dok je meta-analiza deset različitih studija utvrdila umerenu, statistički značajnu pozitivnu korelaciju između koncentracije IGF-1 u krvi i pojave kolonorektalnog karcinoma (7% povećanje rizika) (Rinaldi i sar. 2010). Analize su pokazale da povećanje nivoa IGF-1 u serumu od 100 ng/mL odgovara povećanju rizika od tumora debelog creva od 69% (Rinaldi i sar. 2010). Takođe je pokazano da su visoke koncentracije IGF-1 povezani sa povećanjem tumora prostate od 49%, porastom tumora dojke za 65% i povećanjem rizika od tumora pluća za 106% (Renehan i sar, 2004). Na kraju treba napomenuti da su raniji radovi pokazali da aplikacija IGF-1 kod ljudi izaziva hipoglikemiju (Guler i sar., 1987), uravnoteženje bilansa proteina (Clemmons i sar., 1992), smanjenje koncentracije holesterola i kalijuma (Miell i sar., 1992) kao i poboljšanje funkcije bubrega (Guler i sar., 1989; Hirschberg i sar., 1993). Kod životinja je dokazano da IGF-1 ima pozitivan uticaj na zarastanje rana (Suh i sar., 1992).

Kako je napred napomenuto, izuzetno je mali broj podataka u literaturi o eventualnom uticaju *tireoidnih hormona* prisutnih u mleku krava na zdravlje ljudi. Zna se da tireoidni hormoni kontrolišu metabolizam u gotovo svakom tkivu esencijalni su za normalan rast. Bez benefita tireoidnih hormona, neka tkiva i organi, uključujući ćelije nervnog sistema ne bi mogli da se razviju i funkcionišu normalno (Vass i sar., 2022). Uticaj insulina i glukokortikosteroida prisutnih u mleku krava na zdravlje ljudi nije, prema nama dostupnoj literaturi, posebno izučavano.

3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je da se utvrdi u kojoj meri stadijum laktacije, metaboličko stanje jedinke i sastav mleka utiču na zastupljenost hormona u sirovom mleku krava, kao i da se ispita zastupljenost ovih hormona u komercijalnom mleku sa različitim sadržajem masti (1,5% i 3,2%). Da bi se realizovao ovaj cilj, postavljeni su sledeći istraživački zadaci:

1. Odrediti promene u koncentracijama hormona (IGF-1, insulina, kortizola, tireoidnih hormona, progesterona i estrogena) u različitim periodima laktacije i u laktofrizu.
2. Odrediti koncentracije hormona (IGF-1, insulina, kortizola, tireoidnih hormona, progesterona i estrogena) u komercijalnom mleku sa 1,5% i 3,2 % masti.
3. Odrediti promene u koncentracijama masti i proteina u mleku krava u različitim periodima laktacije i laktofrizu.
4. Potvrditi sadržaj masti i odrediti sadržaj proteina u komercijalnom mleku sa 1,5% i 3,2 % masti.
5. Odrediti promene u koncentracijama insulina u krvi ispitivanih krava
6. Odrediti promene u zastupljenosti različitih biohemijskih parametara (ukupnih proteina, albumina, uree, ukupnog bilirubina, ALTa, ASTa, Ca, P i Mg) u krvi ispitivanih krava
7. Statistički obraditi dobijene rezultate

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1. Eksperimentalne životinje

Četnaest oteljenih krava Holštajn rase su 5. do 7. dana nakon teljenja odabrane sa komercijalne farme mlečnih krava i uključene u ogled. Sve krave su bile višetelkinje, uzrasta 4 do 6 godina. Krave su smeštene u odabranu štalu i držane u slobodnom sistemu. Sve krave su hranjene miksiranim obrokom istog sastava dva puta dnevno tokom čitavog perioda laktacije, sa peletiranom hranom i glicerolom koji je dodavan pri robotskoj ishrani. Sastav obroka je prikazan u Tabeli 3.

Tabela 3. Sastav i nutritivna vrednost hrane krava u laktaciji koje se nalaze na robotskoj muži.

| Sastojci | kg SM/dan |
|---|------------------|
| Kukuruzna silaža | 7,38 |
| Senaža lucerke | 1,70 |
| Silaža raži | 0,81 |
| Seno lucerke | 2,70 |
| Slama pšenična | 0,28 |
| Kukuruz | 1,76 |
| Pšenica | 1,07 |
| Sojina sačma | 2,07 |
| Suncokretova sačma | 0,74 |
| Mipro HP 600 HR* | 0,60 |
| DextroFat Protect* | 0,20 |
| DairyFat C16 DE* | 0,20 |
| Soda bikarbona | 0,18 |
| Magnezijum oksid | 0,06 |
| KemTRACE Cr 0.4** | 0,002 |
| Glicerrol (hranjenje pri robotu) | 0,26 |
| Peletirana hrana (hranjenje pri robotu) | 3,95 |
| Ukupno | 23,96 |
| Nutritivna vrednost (% SM) | |
| Suva materija | 49,78 |
| Sirovi protein | 17,95 |
| RUP | 6,01 |
| RDP | 11,94 |
| ADF | 17,56 |
| Vlakna | 53,82 |
| Vlakna NDF | 21,54 |
| peNDF | 19,27 |
| Šećer | 5,57 |
| Skrob | 24,66 |
| Ukupne masti | 4,85 |
| Ca | 0,93 |
| P | 0,41 |
| Mg | 0,53 |

| | |
|-------------------------|--------|
| DCAD mEq/kg | 240,94 |
| NE _L (MJ/kg) | 7,20 |

* - komercijalni dodaci, premiksi i aditivi, Sano - Modern Animal Nutrition GmbH, Loiching, Germany; ** - Suvi mineralni dodatak (0,4% hroma iz hrom propionata), KEMIN, Iowa, USA; RUP – proteini nerazgradivi u buragu (eng. rumen undegradable protein); RDP – proteini razgradivi u buragu (eng. rumen degradable protein); ADF – kisela deterdžentska vlakna (eng. acid detergent fiber); NDF – neutralna deterdžentska vlakna (eng. neutral detergent fiber); peNDF – Fizički efektivna neutralna deterdžentska vlakna (eng. Physically effective neutral detergent fiber); DCAD – Raspon katjona i anjona u hrani (eng. Dietary Cation-Anion Difference); NEL – neto energija laktacije (eng. Net Energy of Lactation)

Peletirana hrana se sastojala od mlevenog ječmenog zrna, sojine sačme, melase, sojinog ulja i mlevenog zrna kukuruza. Veličina porcije peletirane hrane u obroku je prilagođavana proizvodnji mleka krava tako da su krave sa visokom proizvodnjom primale maksimalno 7 kg tokom prvih 75 dana laktacije, dok su krave pre zasušenja primale najmanje 2,5 kg peletirane hrane. Prosečno, krave su konzumirale 3,95 kg peletirane hrane dok su bile na robijotskoj muži tokom laktacije. Krave su imale slobodan pristup tokom studije. Hrana je inicijalno sastavljena na način da se usaglase ili prevazišle preporuke NRCa (National Research Council, 2021). Zdravstveni status krava je praćen na dnevnom nivou i krave nisu pokazale bilo kakve simptome bolesti tokom cele studije.

Deo studije koji je vezan za životinje je odobren od strane Etičkog komiteta Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, a u skladu sa Nacionalnom legislativom o dobrobiti životinja (broj odobrenja 4/2015).

4.2. Uzorkovanje

Uzorci krvi i mleka od svake životinje u studiji su uzeti u sledećim danima u laktaciji: 10., 30., 60., 90., 150., 180., 210., 250. i 280. Da bi se poredile koncentracije varijabli bez uticaja dnevnog ritma, *uzorci krvi* su uzimani 4 do 6 sati nakon jutarnjeg obroka. Uzorci krvi su uzimani u aseptičnim uslovima direktno iz jugularne vene u vakutajneru zapremine 10,0 mL (*BD Vacutainer, Plymouth, Devon, UK*) bez antikoagulansa i čuvani su na ledu dok se krvni serum nije izdvojio centrifugiranjem na temperaturi od 4°C u trajanju od 20 minuta na 1000g obrtaja, a unutar 2 sata nakon prikupljanja uzoraka. Svi hemolizovani uzorci su odbačeni. Uzorci krvnog seruma su čuvani na -20°C do analiza. Uzorci mleka su uzimani tokom jutarnje muže. *Uzorci mleka* su uzeti pri prvoj muži obavljenoj u 5 sati, a pre jutarnjeg hranjenja, i deponovani su u bočice za čuvanje mleka od 50 ml. Mleko iz laktofriza je takođe uzorkovano u istim danima u kojima je uzorkovano mleko od životinja na muži. Laktofriz je punjen dnevno sa mlekom od približno 150 krava u laktaciji sa farme koja proizvodi prosečno 3000 litara mleka tokom svake muže. Četrnaest uzoraka mleka je skupljeno iz laktofriza tokom svakog perioda uzorkovanja. Uzorci mleka iz laktofriza su sakupljeni u bočice od 50 mL i uzorci su transportovani na ledu (4°C) u laboratoriju i čuvani na -40°C do analiza. Mleko u komercijalnom pakovanju sa 1,5% i 3,2% mlečne masti, pojedinačno, je nabavljeno iz lokalnih prodajnih objekata u Srbiji. Četrnaest uzoraka mleka sa 1,5% i 3,2% mlečne masti, pojedinačno, je alikvotirano i čuvano u bočicama za mleko na -40°C do izvođenja analiza.

4.3. Analize krvi

Svaki uzorak krvi je analiziran na prisustvo insulina (μU/L), glukoze (mmol/L), albumina (g/L), ukupnih proteina (g/L), ukupnog bilirubina (μmol/L), uree u krvi (BUN; mmol/L), aspartat aminotransferaze (AST; U/L), alanin transaminaze (ALT; U/L), kalcijuma (Ca; mmol/L), fosfora (P;

mmol/L) i magnezijuma (Mg; mmol/L). Metaboliti su analizirani korišćenjem odgovarajućih metoda odnosno kitova: insulin (RIA metod), ukupni protein (biuretska reakcija); albumin (metoda sa bojom bromkrezol-zeleno), BUN (metoda reakcije enzima ureaze i glutamat-dehidrogenaze); ukupan bilirubin (metoda sa dijazotizovanom sulfaminskom kiselinom); AST (standardizovana metoda Međunarodne federacije za kliničku hemiju), AST (standardizovana metoda Međunarodne federacije za kliničku hemiju). Analize su izvedene automatski pomoću spektrofotometra (A15; BioSystems S.A., Barselona, Španija). Glukoza je merena odmah nakon uzorkovanja krvi u kapi pune krvi korišćenjem komercijalnih test trakica (Abbott Diabetes CareLtd., Oxon, Velika Britanija).

4.4. Analize mleka

Svaki uzorak mleka je analiziran na prisustvo: IGF-1 (ng/mL), insulina (μ U/mL), slobodnog tiroksina (ng/dL), slobodnog trijodtironina (ng/dL), kortizola (ng/dL), progesterona (ng/mL) i 17β estradiola (pg/mL). Određivanje koncentracije IGF-1 u mlečnom serumu je izvedeno pomoću ELISA komercijalnog kita za IGF-1 proizvedenog od MyBioSource (San Diego, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države) prema uputstvu proizvođača. Određivanje koncentracije insulina u uzorcima je izvedeno korišćenjem RIA metode uz upotrebu komercijalnog kita. Određivanje koncentracije kortizola, slobodnog tiroksina, slobodnog trijodtironina, progesterona i 17β estradiola (iE2) je izvršeno ELISA komercijalnim kitovima za slobodni tiroksin, slobodni trijodtironin, kortizol, progesterona i 17β estradiola izrađenim od Tosoh Corporation (Japan) u skladu sa uputstvom proizvođača.

4.5. Statistička analiza

Podaci su statistički obradjeni korišćenjem softvera STATISTICA, v. 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) i rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška (SEM). Normalnost distribucije podataka je testirana korišćenjem Shapiro-Wilk testa i svi podaci su pokazali normalnu distribuciju ($p > 0,05$). Značajnost razlike u posmatranim parametrima krvi i mleka kod ispitivanih krava, a između različitih perioda laktacije, je analizirana zavisnim Studentovim t-testom. S druge strane, značajnost razlike u koncentraciji hormona između uzoraka mleka ispitivanih krava, laktofriza i mleka u komercijalnom pakovanju je analizirana korišćenjem nezavisnog Studentovog t-testa. Značajnost je postojala ukoliko je $p < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. Promene u koncentracijama hormona, masti i proteina (srednja vrednost \pm SEM) u mleku krava u različitim periodima laktacije

Koncentracije ispitivanih hormona (srednja vrednost \pm SEM) u mleku krava u različitim periodima laktacije prikazane su za svaki ispitivani hormon pojedinačno.

5.1.1. Koncentracija IGF-1

Koncentracija IGF-I u mleku tokom ispitivanih perioda laktacije, kao i laktacioni prosek, koncentracija IGF-I u laktofrizu i komercijalnom mleku sa 1,5 % odnosno 3,2 % masti prikazana je u Tabeli 4.

Tabela 4. Koncentracija IGF-1 (ng/mL) u mleku krava

| | X | SE | CV (%) | Min-Max |
|-------------------------|------|------|--------|------------|
| 10. dan | 9,23 | 0,70 | 28,82 | 5,49-13,51 |
| 30.dan | 8,09 | 0,64 | 29,81 | 3,17-10,96 |
| 60. dan | 6,53 | 0,52 | 29,66 | 1,27-8,98 |
| 90.dan | 3,70 | 0,28 | 28,16 | 1,29-5,23 |
| 150. dan | 3,31 | 0,25 | 28,71 | 1,90-4,92 |
| 180.dan | 3,16 | 0,22 | 26,26 | 1,42-4,55 |
| 210. dan | 2,80 | 0,22 | 29,63 | 1,96-4,80 |
| 250.dan | 6,52 | 0,40 | 22,26 | 4,48-9,23 |
| 280. dan | 4,71 | 0,40 | 28,82 | 3,02-7,05 |
| Laktacioni prosek | 5,34 | 0,22 | 15,49 | 4,12-6,88 |
| Laktofriz | 8,33 | 0,54 | 24,09 | 4,36-11,23 |
| Komercijalno mleko 1,5% | 5,95 | 0,18 | 11,59 | 4,45-7,11 |
| Komercijalno mleko 3,2% | 8,82 | 0,27 | 11,58 | 7,14-10,23 |

Statistička značajnost razlika u koncentraciji IGF-1 u mleku krava između ispitivanih perioda laktacije kao i vrednosti izmerenih u laktofrizu i komercijalnom mleku sa 1,5% odnosno 3,2 % masti prikazana je u Tabeli 5.

Tabela 5. Statistička značajnost razlika (p vrednost) u koncentraciji IGF-1 između ispitivanih uzoraka mleka

| | 10.d | 30.d | 60.d | 90.d | 150.d | 180.d | 210.d | 250.d | 280.d | LP | LF | K1,5 |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| K3,2 | 0,591 | 0,309 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,429 | 0,000 |
| K1,5 | 0,000 | 0,004 | 0,029 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,006 | 0,192 | 0,045 | 0,000 | |
| LF | 0,322 | 0,776 | 0,023 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,011 | 0,062 | 0,000 | | |
| LP | 0,000 | 0,000 | 0,045 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,014 | 0,161 | | | |
| 280.d | 0,000 | 0,000 | 0,008 | 0,034 | 0,003 | 0,001 | 0,000 | 0,002 | | | | |
| 250.d | 0,002 | 0,057 | 0,992 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | |
| 210.d | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,018 | 0,145 | 0,258 | | | | | | |
| 180.d | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,142 | 0,675 | | | | | | | |
| 150.d | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,303 | | | | | | | | |
| 90.d | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | |
| 60.d | 0,005 | 0,049 | | | | | | | | | | |
| 30.d | 0,245 | | | | | | | | | | | |

Legenda: K3,2-Komercijalno mleko sa 3,2% mlečne masti; K1,5- Komercijalno mleko sa 1,5% mlečne masti; LF-mleko iz laktofriza, LP-laktacioni prosek

Iz tabela se zapaža da je koncentracija IGF-1 10. dana laktacije bila najviša ($9,23 \pm 0,70$ ng/mL) i ta vrednost je bila značajno veća u odnosu na sve ostale dane laktacije izuzev u odnosu na 30. dan laktacije kada je iznosila $8,09 \pm 0,64$ ng/mL. Ta vrednost izmerena 30. dana laktacije je bila još uvek visoka, odnosno statistički značajno viša nego u svim narednim danima laktacije, izuzev u odnosu na 250. dan. Takođe, koncentracija IGF-1 izmerena 60. dana laktacije je i dalje bila visoka ($6,53 \pm 0,52$ ng/mL), odnosno statistički značajno viša nego u svim narednim danima laktacije, izuzev u odnosu na 250. dan laktacije. Devedesetog dana laktacije zabeležen je pad u koncentraciji IGF-1 ($3,70 \pm 0,28$ ng/mL) tako da se ova vrednost nije značajno razlikovala od vrednosti utvrđenih 150. i 180. dana laktacije, ali je bila statistički značajno viša od vrednosti utvrđene 210. dana, odnosno statistički značajno niža od vrednosti utvrđene 280. dana laktacije. U narednom periodu (150., 180. i 210. dana laktacije) vrednosti koncentracije IGF-1 u mleku su bile niske ($3,31 \pm 0,25$ ng/mL za 150. dan, $3,16 \pm 0,22$ ng/mL za 180. dan i $2,80 \pm 0,22$ ng/mL za 210. dan) tako da su bile statistički značajno niže od onih utvrđenih 250. i 280. dana kada je došlo do porasta koncentracije IGF-1 ($6,52 \pm 0,40$ ng/mL i $4,71 \pm 0,40$ ng/mL, pojedinačno).

Prosečna koncentracija IGF-1 u laktaciji ($5,34 \pm 0,22$ ng/mL) je bila statistički značano različita u odnosu na vrednosti utvrđene u svim periodima uzorkovanja tokom laktacije, sa izuzetkom vrednosti utvrđene 280. dana laktacije ($4,71 \pm 0,4$ ng/mL). U odnosu na vrednost IGF-1 utvrđenu kao prosečnu vrednost u laktaciji, koncentracije IGF-1 su bile značajno niže u 90. ($3,70 \pm 0,28$ ng/mL), 150. ($3,31 \pm 0,25$ ng/mL), 180. ($3,16 \pm 0,22$ ng/mL) i 210. ($2,80 \pm 0,22$ ng/mL) danu laktacije a statistički značajno više u 10. ($9,23 \pm 0,7$ ng/mL), 30. ($8,09 \pm 0,64$ ng/mL), 60. ($6,53 \pm 0,52$ ng/mL) i 250 danu laktacije ($6,52 \pm 0,4$ ng/mL).

Prosečna koncentracija IGF-1 u laktaciji je bila značajno niža nego u laktofrizu, odnosno komercijalnom mleku sa 1,5% i 3,2% masti.

5.1.2. Koncentracija insulina

Koncentracija insulina u mleku tokom ispitivanih perioda laktacije, kao i laktacioni prosek, koncentracija insulina u laktofrizu i komercijalnom mleku sa 1,5 odnosno 3,2 % masti prikazana je u Tabeli 6.

Tabela 6. Koncentracija insulina (μ U/mL) u mleku krava

| | X | SE | CV (%) | Min-Max |
|-------------------------|-------|------|--------|-------------|
| 10. dan | 16,36 | 1,70 | 26,63 | 10,40-24,60 |
| 30. dan | 13,80 | 0,95 | 25,79 | 9,40-20,90 |
| 60. dan | 15,94 | 0,96 | 22,65 | 10,70-22,40 |
| 90. dan | 15,24 | 1,12 | 27,45 | 8,50-24,50 |
| 150. dan | 20,07 | 1,46 | 27,36 | 13,90-32,90 |
| 180. dan | 16,23 | 1,02 | 23,55 | 11,40-24,30 |
| 210. dan | 20,17 | 1,01 | 18,79 | 16,10-26,70 |
| 250. dan | 20,33 | 1,10 | 19,47 | 13,70-25,40 |
| 280. dan | 20,66 | 1,50 | 27,07 | 14,10-29,70 |
| Laktacioni prosek | 17,59 | 0,60 | 11,98 | 14,67-21,83 |
| Laktofriz | 8,33 | 0,54 | 10,99 | 14,30-19,90 |
| Komercijalno mleko 1,5% | 5,95 | 0,18 | 28,66 | 8,26-19,56 |
| Komercijalno mleko 3,2% | 8,82 | 0,27 | 17,99 | 11,59-22,12 |

Statistička značajnost razlika u koncentraciji insulina u mleku krava između ispitivanih perioda laktacije kao i vrednosti izmerenih u laktofrizu i komercijalnom mleku sa 1,5% odnosno 3,2 % masti prikazana je u Tabeli 7.

Tabela 7. Statistička značajnost razlika (p vrednost) u koncentraciji insulina između ispitivanih uzoraka mleka

| | 10.d | 30.d | 60.d | 90.d | 150.d | 180.d | 210.d | 250.d | 280.d | LP | LF | K1,5 |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| K3,2 | 0,114 | 0,001 | 0,041 | 0,021 | 0,459 | 0,073 | 0,313 | 0,272 | 0,291 | 0,275 | 0,052 | 0,000 |
| K1,5 | 0,068 | 0,781 | 0,083 | 0,237 | 0,000 | 0,062 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,001 | 0,012 | |
| LF | 0,946 | 0,019 | 0,642 | 0,331 | 0,027 | 0,851 | 0,003 | 0,002 | 0,013 | 0,137 | | |
| LP | 0,352 | 0,002 | 0,015 | 0,042 | 0,126 | 0,257 | 0,035 | 0,030 | 0,046 | | | |
| 280.d | 0,032 | 0,001 | 0,013 | 0,007 | 0,782 | 0,022 | 0,790 | 0,862 | | | | |
| 250.d | 0,018 | 0,000 | 0,005 | 0,003 | 0,885 | 0,009 | 0,911 | | | | | |
| 210.d | 0,020 | 0,000 | 0,006 | 0,003 | 0,956 | 0,011 | | | | | | |
| 180.d | 0,934 | 0,093 | 0,836 | 0,518 | 0,041 | | | | | | | |
| 150.d | 0,058 | 0,001 | 0,027 | 0,015 | | | | | | | | |
| 90.d | 0,493 | 0,335 | 0,639 | | | | | | | | | |
| 60.d | 0,782 | 0,013 | | | | | | | | | | |
| 30.d | 0,100 | | | | | | | | | | | |

Legenda: K3,2-Komercijalno mleko sa 3,2% mlečne masti; K1,5- Komercijalno mleko sa 1,5% mlečne masti; LF-mleko iz laktofriza, LP-laktacioni prosek

Iz tabela se zapaža da je koncentracija insulina 10. dana laktacije bila $16,36 \pm 1,70 \mu\text{U/mL}$ i ta vrednost je se nije značajno razlikovala od vrednosti utvrđenih u ostalim danima laktacije izuzev u odnosu na 210. ($20,17 \pm 1,46 \mu\text{U/mL}$) 250. ($20,33 \pm 1,10 \mu\text{U/mL}$) i 280. dan laktacije ($20,66 \pm 1,50 \mu\text{U/mL}$), kada je utvrđena značajno viša koncentracija insulina u odnosu na 10. dan laktacije. Vrednost koncentracije insulina izmerena 30. dana laktacije ($13,80 \pm 0,95 \mu\text{U/mL}$) je bila i dalje značajno niža u odnosu na 210., 250. i 280. dan laktacije, ali i u odnosu na 60. i 150. dan laktacije. Šezdesetog i devedesetog dana laktacije koncentracija insulina su bile $15,94 \pm 0,96$ i $15,24 \pm 1,12 \mu\text{U/mL}$, pojedinačno, i bile su i dalje statistički značajno niže u odnosu na 150., 210., 250. i 280. dan laktacije. Sto pedesetog dana laktacije koncentracija insulina je statistički značajno porasla u odnosu na vrednosti određene u prethodnim danima laktacije i iznosila je $20,07 \pm 1,46 \mu\text{U/mL}$. Ova vrednost je bila statistički značajno veća i u odnosu na vrednost određenu 180. dana laktacije. Sto osamdesetog dana laktacije se vrednost insulina smanjila i iznosila je $16,23 \pm 1,02 \mu\text{U/mL}$ tako da je bila statistički značajno niža u odnosu na vrednosti utvrđene 210., 250. i 280. dana laktacije. U poslednja tri merenja koncentracije insulin tokom laktacije, odnosno 210., 250. i 280. dana laktacije su vrednosti ponovo povećale ($20,17 \pm 1,01 \mu\text{U/mL}$, $20,33 \pm 1,10 \mu\text{U/mL}$ i $20,66 \pm 1,50 \mu\text{U/mL}$, pojedinačno) i nisu se međusobno statistički razlikovale.

Iz table se zapaža da je prosečna koncentracija insulina u laktaciji ($17,59 \pm 0,60 \mu\text{U/mL}$) bila značano različita u odnosu na vrednosti utvrđene u svim periodima uzorkovanja tokom laktacije, sa izuzetkom vrednosti utvrđenih 10. ($16,36 \pm 1,70 \mu\text{U/mL}$), 150. ($20,07 \pm 1,46 \mu\text{U/mL}$) i 180. dana laktacije ($16,23 \pm 1,02 \mu\text{U/mL}$). U odnosu na vrednost insulina utvrđenu kao prosečnu vrednost u laktaciji, koncentracije insulina su bile značajno niže u 30. ($13,80 \pm 0,95 \mu\text{U/mL}$), 60. ($15,94 \pm 0,96 \mu\text{U/mL}$) i 90. ($15,24 \pm 1,12 \mu\text{U/mL}$) danu laktacije a statistički značajno više u 210. ($20,17 \pm 1,01 \mu\text{U/mL}$), 250. ($20,33 \pm 1,10 \mu\text{U/mL}$) i 280. ($20,66 \pm 1,50 \mu\text{U/mL}$) danu laktacije.

Prosečna koncentracija insulina u laktaciji je bila značajno viša nego u komercijalnom mleku sa 1,5% masti.

5.1.3. Koncentracija slobodnog tiroksina

Koncentracija slobodnog tiroksina u mleku tokom ispitivanih perioda laktacije, kao i laktacioni prosek, koncentracija slobodnog tiroksina u laktofrizu i komercijalnom mleku sa 1,5 odnosno 3,2 % masti prikazana je u Tabeli 8.

Tabela 8. Koncentracija slobodnog tiroksina (ng/dL) u mleku krava

| | X | SE | CV (%) | Min-Max |
|-------------------------|-------|-------|--------|-------------|
| 10. dan | 0,217 | 0,004 | 7,09 | 0,190-0,240 |
| 30.dan | 0,212 | 0,007 | 13,35 | 0,160-0,250 |
| 60. dan | 0,203 | 0,005 | 10,66 | 0,170-0,250 |
| 90.dan | 0,218 | 0,007 | 11,55 | 0,160-0,270 |
| 150. dan | 0,209 | 0,010 | 8,48 | 0,180-0,250 |
| 180.dan | 0,216 | 0,007 | 12,24 | 0,180-0,260 |
| 210. dan | 0,216 | 0,012 | 20,15 | 0,140-0,320 |
| 250.dan | 0,239 | 0,010 | 11,29 | 0,210-0,300 |
| 280. dan | 0,198 | 0,010 | 17,30 | 0,140-0,270 |
| Laktacioni prosek | 0,214 | 0,002 | 3,90 | 0,196-0,225 |
| Laktofriz | 0,233 | 0,007 | 11,35 | 0,180-0,270 |
| Komercijalno mleko 1,5% | 0,139 | 0,006 | 16,04 | 0,100-0,160 |
| Komercijalno mleko 3,2% | 0,191 | 0,003 | 5,62 | 0,180-0,210 |

Statistička značajnost razlika u koncentraciji slobodnog tiroksina u mleku krava između ispitivanih perioda laktacije kao i vrednosti izmerenih u laktofrizu i komercijalnom mleku sa 1,5% odnosno 3,2 % masti prikazana je u Tabeli 5.

Tabela 9. Statistička značajnost razlika (p vrednost) u koncentraciji slobodnog tiroksina između ispitivanih uzoraka mleka

| | 10.d | 30.d | 60.d | 90.d | 150.d | 180.d | 210.d | 250.d | 280.d | LP | LF | K1,5 |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| K3,2 | 0,000 | 0,014 | 0,071 | 0,001 | 0,002 | 0,002 | 0,042 | 0,000 | 0,463 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| K1,5 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | |
| LF | 0,066 | 0,056 | 0,003 | 0,136 | 0,010 | 0,112 | 0,239 | 0,530 | 0,005 | 0,019 | | |
| LP | 0,558 | 0,780 | 0,075 | 0,626 | 0,341 | 0,783 | 0,863 | 0,053 | 0,091 | | | |
| 280.d | 0,045 | 0,239 | 0,648 | 0,089 | 0,278 | 0,120 | 0,221 | 0,001 | | | | |
| 250.d | 0,013 | 0,015 | 0,000 | 0,039 | 0,002 | 0,003 | 0,107 | | | | | |
| 210.d | 0,954 | 0,760 | 0,306 | 0,916 | 0,575 | 1,000 | | | | | | |
| 180.d | 0,931 | 0,683 | 0,149 | 0,885 | 0,409 | | | | | | | |
| 150.d | 0,222 | 0,752 | 0,398 | 0,307 | | | | | | | | |
| 90.d | 0,928 | 0,578 | 0,103 | | | | | | | | | |
| 60.d | 0,055 | 0,339 | | | | | | | | | | |
| 30.d | 0,567 | | | | | | | | | | | |

Legenda: K3,2-Komercijalno mleko sa 3,2% mlečne masti; K1,5- Komercijalno mleko sa 1,5% mlečne masti; LF-mleko iz laktofriža, LP-laktacioni prosek

Iz tabela se zapaža da je koncentracija slobodnog tiroksina 10. dana laktacije bila $0,217 \pm 0,004$ ng/dL i ta vrednost se nije značajno razlikovala od vrednosti utvrđenih u ostalim danima laktacije izuzev u odnosu na 250. dan laktacije ($0,239 \pm 0,010$ ng/dL) kada je utvrđena znatno viša vrednost i 280. dan laktacije ($0,198 \pm 0,010$ ng/dL), kada je utvrđena značajno niža vrednost koncentracije slobodnog tiroksina u odnosu na 10. dan laktacije. U merenjima obavljenim 30., 60., 90., 150. i 180. dana laktacije koncentracije slobodnog tiroksina ($0,212 \pm 0,007$ ng/dL, $0,203 \pm 0,005$ ng/dL, $0,218 \pm 0,007$ ng/dL,

0,209±0,010 ng/dL i 0,216±0,007 ng/dL, pojedinačno) se nisu značajno razlikovale međusobno i u odnosu na vrednosti utvrđene u ostalim danima laktacije izuzev u odnosu na 250. dan laktacije kada je utvrđena vrednost koncentracije slobodnog tiroksina (0,239±0,010 ng/dL) bila statistički značajno viša u odnosu na vrednosti utvrđene od 30. do 180. dana laktacije. Dvestadesetog dana laktacije vrednosti koncentracije slobodnog tiroksina (0,216±0,012 ng/dL) se nisu statistički značajno razlikovale od vrednosti utvrđenih 250. i 280. dana laktacije (0,239±0,010 ng/dL i 0,198±0,010 ng/dL, pojedinačno) dok je vrednost izmerena 250. dana bila značajno viša od vrednosti utvrđene 280. dana laktacije.

Iz table se takođe zapaža da je prosečna koncentracija slobodnog tiroksina u laktaciji (0,214±0,002 ng/dL) bila značano različita u odnosu na vrednosti utvrđene u svim periodima uzorkovanja tokom laktacije, sa izuzetkom vrednosti utvrđenih 250. dana laktacije (0,239±0,010 ng/dL) kada je bila statistički značajno viša.

Prosečna koncentracija slobodnog tiroksina u laktaciji je bila značajno viša nego u komercijalnom mleku sa 1,5% i 3,2% masti, ali značajno niža nego vrednost određena u laktofrizu.

5.1.4. Koncentracija slobodnog trijodtironina

Koncentracija slobodnog trijodtironina u mleku tokom ispitivanih perioda laktacije, kao i laktacioni prosek, koncentracija insulina u laktofrizu i komercijalnom mleku sa 1,5 odnosno 3,2 % masti prikazana je u Tabeli 10.

Tabela 10. Koncentracija slobodnog trijodtironina (ng/dL) u mleku krava

| | X | SE | CV (%) | Min-Max |
|-------------------------|------|------|--------|-----------|
| 10. dan | 6,56 | 0,44 | 25,24 | 3,96-9,18 |
| 30. dan | 3,87 | 0,21 | 20,10 | 2,37-4,95 |
| 60. dan | 3,38 | 0,26 | 28,45 | 1,45-4,85 |
| 90. dan | 3,93 | 0,31 | 29,74 | 2,31-6,31 |
| 150. dan | 5,33 | 0,42 | 29,67 | 3,00-8,48 |
| 180. dan | 6,61 | 0,34 | 19,49 | 4,04-8,73 |
| 210. dan | 5,21 | 0,31 | 22,09 | 3,49-8,05 |
| 250. dan | 4,54 | 0,20 | 17,19 | 3,33-6,05 |
| 280. dan | 3,14 | 0,22 | 26,72 | 1,23-4,71 |
| Laktacioni prosek | 4,73 | 0,14 | 11,28 | 4,14-5,77 |
| Laktofriz | 4,77 | 0,31 | 24,46 | 3,45-6,75 |
| Komercijalno mleko 1,5% | 3,79 | 0,24 | 23,42 | 2,87-5,02 |
| Komercijalno mleko 3,2% | 6,09 | 0,23 | 14,29 | 4,56-7,14 |

Statistička značajnost razlika u koncentraciji slobodnog trijodtironina u mleku krava između ispitivanih perioda laktacije kao i vrednosti izmerenih u laktofrizu i komercijalnom mleku sa 1,5% odnosno 3,2 % masti prikazana je u Tabeli 11.

Tabela 11. Statistička značajnost razlika (p vrednost) u koncentraciji slobodnog trijodtironina između ispitivanih uzoraka mleka

| | 10.d | 30.d | 60.d | 90.d | 150.d | 180.d | 210.d | 250.d | 280.d | LP | LF | K1,5 |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| K3,2 | 0,358 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,127 | 0,227 | 0,032 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,002 | 0,000 |
| K1,5 | 0,000 | 0,795 | 0,254 | 0,720 | 0,004 | 0,000 | 0,001 | 0,026 | 0,059 | 0,002 | 0,019 | |
| LF | 0,003 | 0,024 | 0,002 | 0,068 | 0,300 | 0,000 | 0,324 | 0,530 | 0,000 | 0,899 | | |
| LP | 0,001 | 0,002 | 0,000 | 0,028 | 0,191 | 0,000 | 0,165 | 0,447 | 0,000 | | | |
| 280.d | 0,000 | 0,024 | 0,491 | 0,051 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | |
| 250.d | 0,000 | 0,033 | 0,002 | 0,121 | 0,104 | 0,000 | 0,079 | | | | | |
| 210.d | 0,019 | 0,002 | 0,000 | 0,007 | 0,828 | 0,006 | | | | | | |
| 180.d | 0,935 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,027 | | | | | | | |
| 150.d | 0,045 | 0,005 | 0,000 | 0,013 | | | | | | | | |
| 90.d | 0,000 | 0,876 | 0,186 | | | | | | | | | |
| 60.d | 0,000 | 0,150 | | | | | | | | | | |
| 30.d | 0,000 | | | | | | | | | | | |

Legenda: K3,2-Komercijalno mleko sa 3,2% mlečne masti; K1,5- Komercijalno mleko sa 1,5% mlečne masti; LF-mleko iz laktofriza, LP-laktacioni prosek

Iz tabela se zapaža da je koncentracija slobodnog trijodtironina 10. dana laktacije bila $6,56 \pm 0,44$ ng/dL i ta vrednost je bila statistički značajno viša u odnosu na sve vrednosti određene u ostalim danima laktacije, izuzev u odnosu na vrednost određenu 180. dana laktacije kada je vrednost koncentracije slobodnog trijodtironina bila $6,61 \pm 0,34$ ng/dL. Koncentracija slobodnog trijodtironina 30. dana laktacije bila je $3,87 \pm 0,21$ ng/dL i bila je značajno niža od vrednosti utvrđenih 90., 150., 180., 210. i 250. dana, dok je bila značajno viša od vrednosti utvrđene 280. dana laktacije. Koncentracija slobodnog trijodtironina utvrđena 60. dana iznosila je $3,38 \pm 0,26$ ng/dL i bila je značajno niža u odnosu na vrednosti utvrđene 150., 180., 210. i 250. dana laktacije. Koncentracija slobodnog trijodtironina utvrđena 90. dana laktacije iznosila je $3,93 \pm 0,31$ ng/dL i bila je značajno niža u odnosu na vrednosti utvrđene 150., 180. i 210. dan laktacije. Koncentracija slobodnog trijodtironina utvrđena 150. dana laktacije iznosila je $3,93 \pm 0,31$ ng/dL i bila je značajno niža u odnosu na vrednosti utvrđene 180. dana laktacije a značajno viša u odnosu na vrednost utvrđenu 210. dan laktacije. Koncentracija slobodnog trijodtironina je 210. dana laktacije bila $5,21 \pm 0,31$ ng/dL i bila je značajno viša u odnosu na 280. dan laktacije, dok je koncentracija slobodnog trijodtironina 250. dana laktacije bila $4,54 \pm 0,20$ ng/dL odnosno značajno niža od vrednosti utvrđene 280. dana laktacije.

Iz tabele se takođe zapaža da je prosečna koncentracija slobodnog trijodtironina u laktaciji ($4,73 \pm 0,14$ ng/dL) bila značajno različita u odnosu na vrednosti utvrđene u svim periodima uzorkovanja tokom laktacije, sa izuzetkom vrednosti utvrđenih 150. ($5,33 \pm 0,42$ ng/dL), 210. ($5,21 \pm 0,31$ ng/dL) i 250. dana laktacije ($4,54 \pm 0,20$ ng/dL). U odnosu na vrednost slobodnog trijodtironina utvrđenu kao prosečnu vrednost u laktaciji, koncentracije slobodnog trijodtironina su bile značajno niže u 30. ($3,87 \pm 0,21$ ng/dL), 60. ($3,38 \pm 0,26$ ng/dL), 90. ($3,93 \pm 0,31$ ng/dL) i 280. danu laktacije ($3,14 \pm 0,22$ ng/dL) a statistički značajno više u 10. ($6,56 \pm 0,44$ ng/dL) i 180. danu laktacije ($6,61 \pm 0,34$ ng/dL).

Prosečna koncentracija slobodnog trijodtironina u laktaciji je bila značajno viša nego u komercijalnom mleku sa 1,5% masti, ali značajno niža nego vrednost određena u komercijalnom mleku sa 3,2% masti.

5.1.5. Koncentracija kortizola

Koncentracija kortizola u mleku tokom ispitivanih perioda laktacije, kao i laktacioni prosek, koncentracija kortizola u laktofrizu i komercijalnom mleku sa 1,5 odnosno 3,2 % masti prikazana je u Tabeli 12.

Tabela 12. Koncentracija kortizola (ng/dL) u mleku krava

| | X | SE | CV (%) | Min-Max |
|-------------------------|-------|-------|--------|-----------|
| 10. dan | 0,336 | 0,015 | 16,55 | 0,25-0,45 |
| 30. dan | 0,321 | 0,018 | 21,62 | 0,23-0,51 |
| 60. dan | 0,259 | 0,013 | 20,01 | 0,20-0,38 |
| 90. dan | 0,315 | 0,015 | 18,33 | 0,22-0,42 |
| 150. dan | 0,301 | 0,020 | 28,88 | 0,23-0,55 |
| 180. dan | 0,298 | 0,020 | 22,40 | 0,21-0,43 |
| 210. dan | 0,307 | 0,020 | 24,99 | 0,22-0,45 |
| 250. dan | 0,342 | 0,010 | 9,32 | 0,29-0,40 |
| 280. dan | 0,259 | 0,014 | 20,83 | 0,22-0,38 |
| Laktacioni prosek | 0,304 | 0,010 | 8,02 | 0,27-0,36 |
| Laktofriz | 0,357 | 0,016 | 16,68 | 0,26-0,44 |
| Komercijalno mleko 1,5% | 0,229 | 0,011 | 19,24 | 0,16-0,30 |
| Komercijalno mleko 3,2% | 0,342 | 0,016 | 17,77 | 0,26-0,42 |

Statistička značajnost razlika u koncentraciji kortizola u mleku krava između ispitivanih perioda laktacije kao i vrednosti izmerenih u laktofrizu i komercijalnom mleku sa 1,5% odnosno 3,2 % masti prikazana je u Tabeli 13.

Tabela 13. Statistička značajnost razlika (p vrednost) u koncentraciji kortizola između ispitivanih uzoraka mleka

| | 10.d | 30.d | 60.d | 90.d | 150.d | 180.d | 210.d | 250.d | 280.d | LP | LF | K1,5 |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| K3,2 | 0,784 | 0,407 | 0,001 | 0,245 | 0,160 | 0,082 | 0,191 | 1,000 | 0,001 | 0,051 | 0,519 | 0,000 |
| K1,5 | 0,000 | 0,000 | 0,108 | 0,000 | 0,010 | 0,003 | 0,003 | 0,000 | 0,123 | 0,000 | 0,000 | |
| LF | 0,345 | 0,157 | 0,000 | 0,073 | 0,006 | 0,022 | 0,065 | 0,418 | 0,000 | 0,005 | | |
| LP | 0,062 | 0,399 | 0,007 | 0,517 | 0,891 | 0,758 | 0,907 | 0,002 | 0,007 | | | |
| 280.d | 0,000 | 0,013 | 0,977 | 0,013 | 0,035 | 0,047 | 0,047 | 0,000 | | | | |
| 250.d | 0,726 | 0,318 | 0,000 | 0,143 | 0,109 | 0,037 | 0,125 | | | | | |
| 210.d | 0,261 | 0,608 | 0,066 | 0,743 | 0,851 | 0,759 | | | | | | |
| 180.d | 0,119 | 0,384 | 0,097 | 0,480 | 0,931 | | | | | | | |
| 150.d | 0,217 | 0,503 | 0,137 | 0,611 | | | | | | | | |
| 90.d | 0,346 | 0,810 | 0,012 | | | | | | | | | |
| 60.d | 0,001 | 0,013 | | | | | | | | | | |
| 30.d | 0,541 | | | | | | | | | | | |

Legenda: K3,2-Komercijalno mleko sa 3,2% mlečne masti; K1,5- Komercijalno mleko sa 1,5% mlečne masti; LF-mleko iz laktofriza, LP-laktacioni prosek

Iz tabela se zapaža da je koncentracija kortizola 10. i 30. dana laktacije bila $0,336 \pm 0,015$ ng/dL i $0,321 \pm 0,018$ ng/dL, pojedinačno, i da se te vrednosti nisu statistički značajno razlikovale u odnosu na vrednosti dobijene tokom ostalih dana laktacije sa izuzetkom vrednosti dobijenih 60. i 250. dana laktacije koje su bile statistički značajno niže u odnosu na vrednost dobijenu 10. dana laktacije, pojedinačno. Vrednost koncentracije kortizola se smanjila 60. dana laktacije i iznosila je $0,259 \pm 0,013$ ng/dL, odnosno bila je statistički značajno niža u odnosu na vrednosti određene 90. i 250. dana

laktacije. Vrednosti koncentracije kortizola određene 90., 150., 180., 210. i 250. dana laktacije ($0,315 \pm 0,015$ ng/dL, $0,301 \pm 0,020$ ng/dL, $0,298 \pm 0,020$ ng/dL, $0,307 \pm 0,020$ ng/dL, $0,342 \pm 0,010$ ng/dL, pojedinačno) se nisu međusobno statistički razlikovale s tim da je koncentracija određena 180. dana bila statistički značajno niža u odnosu na vrednost određenu 210. dana, a sve vrednosti su bile statistički značajno više od vrednosti utvrđene 280. dana laktacije ($0,259 \pm 0,014$ ng/dL). Iz tabele se takođe zapaža da je prosečna koncentracija kortizola u laktaciji bila $0,304 \pm 0,010$ ng/dL i nije bila značano različita u odnosu na vrednosti utvrđene u ostalim periodima uzorkovanja tokom laktacije, sa izuzetkom vrednosti utvrđenih 60. ($0,259 \pm 0,013$ ng/dL) i 280. dana laktacije ($0,259 \pm 0,014$ ng/dL) kada je bila statistički značajno niža, odnosno 250. dana laktacije ($0,342 \pm 0,010$ ng/dL) kada je bila značajno viša u odnosu na prosečnu koncentraciju kortizola u laktaciji.

Prosečna koncentracija kortizola u laktaciji je bila značajno viša nego u komercijalnom mleku sa 1,5% masti. Prosečna koncentracija kortizola u laktaciji je bila značajno niža nego vrednost određena u laktofrizu.

5.1.6. Koncentracija progesterona

Koncentracija progesterona u mleku tokom ispitivanih perioda laktacije, kao i laktacioni prosek, koncentracija progesterona u laktofrizu i komercijalnom mleku sa 1,5 odnosno 3,2 % masti prikazana je u Tabeli 14.

Tabela 14. Koncentracija progesterona (ng/mL) u mleku krava

| | X | SE | CV (%) | Min-Max |
|-------------------------|-------|------|--------|-------------|
| 10. dan | 3,41 | 0,16 | 18,20 | 2,05-4,14 |
| 30. dan | 5,55 | 0,24 | 16,44 | 4,25-7,25 |
| 60. dan | 8,54 | 0,29 | 13,13 | 6,54-10,17 |
| 90. dan | 10,48 | 0,44 | 15,71 | 8,23-12,79 |
| 150. dan | 22,11 | 0,54 | 9,11 | 18,54-25,43 |
| 180. dan | 25,12 | 0,58 | 8,68 | 21,36-28,69 |
| 210. dan | 21,20 | 0,54 | 9,52 | 17,54-24,56 |
| 250. dan | 19,13 | 0,57 | 11,18 | 15,42-22,56 |
| 280. dan | 16,21 | 0,47 | 10,86 | 12,56-18,96 |
| Laktacioni prosek | 14,64 | 0,26 | 6,79 | 13,03-16,33 |
| Laktofriz | 10,28 | 0,34 | 12,47 | 8,69-13,15 |
| Komercijalno mleko 1,5% | 7,42 | 0,07 | 3,51 | 7,00-7,80 |
| Komercijalno mleko 3,2% | 9,96 | 0,29 | 11,06 | 8,89-12,87 |

Statistička značajnost razlika u koncentraciji progesterona u mleku krava između ispitivanih perioda laktacije kao i vrednosti izmerenih u laktofrizu i komercijalnom mleku sa 1,5% odnosno 3,2 % masti prikazana je u Tabeli 15.

Tabela 15. Statistička značajnost razlika (p vrednost) u koncentraciji progesterona između ispitivanih uzoraka mleka

| | 10.d | 30.d | 60.d | 90.d | 150.d | 180.d | 210.d | 250.d | 280.d | LP | LF | K1,5 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| K3,2 | 0,000 | 0,000 | 0,002 | 0,338 | 0,000 | 0,000 | 0,014 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,492 | 0,000 |
| K1,5 | 0,000 | 0,000 | 0,001 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | |
| LF | 0,000 | 0,000 | 0,001 | 0,719 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | |
| LP | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,074 | | | |
| 280.d | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | |
| 250.d | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | |
| 210.d | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,243 | 0,000 | | | | | | |
| 180.d | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | |
| 150.d | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | |
| 90.d | 0,000 | 0,000 | 0,001 | | | | | | | | | |
| 60.d | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | | |
| 30.d | 0,000 | | | | | | | | | | | |

Legenda: K3,2-Komercijalno mleko sa 3,2% mlečne masti; K1,5- Komercijalno mleko sa 1,5% mlečne masti; LF-mleko iz laktofriza, LP-laktacioni prosek

Iz tabela se zapaža da je koncentracija progesterona statistički značajno rasla od 10. do 180. dana laktacije, tako da je vrednost utvrđena 10. dana ($3,41 \pm 0,16$ ng/mL) bila statistički značajno niža u odnosu na sve ostale periode laktacije, vrednost utvrđena 30. dana ($5,55 \pm 0,24$ ng/mL) bila statistički značajno niža u odnosu na sve naredne periode laktacije, vrednost utvrđena 60. dana ($8,54 \pm 0,29$ ng/mL) bila statistički značajno niža u odnosu na sve naredne periode laktacije, vrednost utvrđena 90. dana ($10,48 \pm 0,44$ ng/mL) bila statistički značajno niža u odnosu na sve naredne periode laktacije i vrednost utvrđena 150. dana ($22,11 \pm 0,54$ ng/mL) bila statistički značajno niža u odnosu na sve naredne periode laktacije (izuzev 210. dana laktacije). Nakon toga vrednosti koncentracije progesterone su se smanjivale tako da je 180. dana koncentracija progesterona bila $25,12 \pm 0,58$ ng/mL, odnosno statistički značajno viša od svih narednih perioda laktacije. Koncentracija progesterona određena 210. dana laktacije je bila $21,20 \pm 0,54$ ng/mL, odnosno statistički značajno viša od svih narednih perioda laktacije. Koncentracija progesterona određena 250. dana laktacije je bila $19,13 \pm 0,57$ ng/mL, odnosno statistički značajno viša od vrednosti utvrđene 280. dana laktacije ($16,21 \pm 0,47$ ng/mL).

Iz tabele se takođe zapaža da je prosečna koncentracija progesterona u laktaciji bila $14,64 \pm 0,26$ ng/mL i bila je značano različita u odnosu na vrednosti utvrđene u ostalim periodima uzorkovanja tokom laktacije, sa izuzetkom vrednosti utvrđenih 280. dana laktacije ($16,21 \pm 0,47$ ng/mL). Naime, koncentracije progesterona određene 10. dana ($3,41 \pm 0,16$ ng/mL), 30. dana ($5,55 \pm 0,24$ ng/mL), 60. dana ($8,54 \pm 0,29$ ng/mL) i 90. dana laktacije ($10,48 \pm 0,44$ ng/mL) su bile statistički značajno niže a koncentracije određene 150. dana ($22,11 \pm 0,54$ ng/mL), 180. dana ($25,12 \pm 0,58$ ng/mL), 210. dana ($21,12 \pm 0,54$ ng/mL) i 250. dana ($19,13 \pm 0,57$ ng/mL) laktacije su bile statistički značajno više u odnosu na laktacioni prosek.

Prosečna koncentracija progesterona u laktaciji je bila značajno viša nego u komercijalnom mleku sa 1,5% i 3,2 % masti. Interesantno je da je vrednost za koncentraciju progesterona u komercijalnom mleku sa 3,2% masti bila značajno viša nego u komercijalnom mleku sa 1,5% masti.

5.1.7. Koncentracija 17-estradiola

Koncentracija 17 β -estradiola u mleku tokom ispitivanih perioda laktacije, kao i laktacioni prosek, koncentracija estrogena u laktofrizu i komercijalnom mleku sa 1,5 odnosno 3,2 % masti prikazana je u Tabeli 16.

Tabela 16. Koncentracija 17 β -estradiola (pg/mL) u mleku krava

| | X | SE | CV (%) | Min-Max |
|-------------------------|-------|------|--------|-------------|
| 10. dan | 2,84 | 0,12 | 16,33 | 2,11-3,76 |
| 30. dan | 2,89 | 0,15 | 19,86 | 2,25-4,01 |
| 60. dan | 2,99 | 0,12 | 15,60 | 2,24-3,90 |
| 90. dan | 7,47 | 0,28 | 14,07 | 5,34-8,71 |
| 150. dan | 9,82 | 0,28 | 10,79 | 8,31-12,28 |
| 180. dan | 18,22 | 0,51 | 10,58 | 15,36-21,52 |
| 210. dan | 20,29 | 0,35 | 6,52 | 18,05-22,52 |
| 250. dan | 26,35 | 0,38 | 5,35 | 24,19-28,21 |
| 280. dan | 25,45 | 0,64 | 9,49 | 21,54-29,89 |
| Laktacioni prosek | 12,93 | 0,15 | 4,33 | 11,79-13,87 |
| Laktofriz | 15,68 | 0,41 | 9,79 | 14,44-18,99 |
| Komercijalno mleko 1,5% | 12,69 | 0,52 | 15,36 | 10,23-16,25 |
| Komercijalno mleko 3,2% | 15,78 | 0,59 | 13,89 | 12,36-19,63 |

Statistička značajnost razlika u koncentraciji 17 β -estradiola u mleku krava između ispitivanih perioda laktacije kao i vrednosti izmerenih u laktofrizu i komercijalnom mleku sa 1,5% odnosno 3,2 % masti prikazana je u Tabeli 17.

Tabela 17. Statistička značajnost razlika (p vrednost) u koncentraciji 17 β -estradiola između ispitivanih uzoraka mleka

| | 10.d | 30.d | 60.d | 90.d | 150.d | 180.d | 210.d | 250.d | 280.d | LP | LF | K1,5 |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| K3,2 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,004 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,889 | 0,000 |
| K1,5 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,672 | 0,000 | |
| LF | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,001 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | |
| LP | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,074 | | | |
| 280.d | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,236 | | | | |
| 250.d | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | |
| 210.d | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,003 | | | | | | |
| 180.d | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | |
| 150.d | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | |
| 90.d | 0,000 | 0,000 | 0,001 | | | | | | | | | |
| 60.d | 0,391 | 0,597 | | | | | | | | | | |
| 30.d | 0,810 | | | | | | | | | | | |

Legenda: K3,2-Komercijalno mleko sa 3,2% mlečne masti; K1,5- Komercijalno mleko sa 1,5% mlečne masti; LF-mleko iz laktofriza, LP-laktacioni prosek

Iz tabela se zapaža da je koncentracija 17 β -estradiola bila niska 10., 30. i 60. dana laktacije (2,84 \pm 0,12 pg/mL, 2,89 \pm 0,15 pg/mL i 2,99 \pm 0,12 pg/mL, pojedinačno), pri čemu se ove vrednosti 17 β -estradiola nisu međusobno statistički značajno razlikovale. Nakon toga je koncentracija 17 β -estradiola rasla tako da je 90. dana laktacije bila 7,47 \pm 0,28 pg/mL i bila je statistički značajno niža od vrednosti utvrđenih u narednim periodima laktacije, 150. dana laktacije je bila 9,82 \pm 0,28 pg/mL i bila je statistički značajno niža od vrednosti utvrđenih u narednim periodima laktacije, 180. dana laktacije je bila 18,22 \pm 0,51 pg/mL i bila je statistički značajno niža od vrednosti utvrđenih u narednim periodima laktacije, 210. dana laktacije je bila 20,29 \pm 0,35 pg/mL i bila je statistički značajno niža od vrednosti utvrđenih u narednim periodima laktacije dok je 250. dana laktacije bila 26,35 \pm 0,38 pg/mL i bila je statistički značajno niža od vrednosti utvrđene 280. dana laktacije (25,45 \pm 0,64 pg/mL).

Iz tabele se zapaža da je prosečna koncentracija 17 β -estradiola u laktaciji bila 12,93 \pm 0,15 pg/mL i bila je značano različita u odnosu na vrednosti utvrđene u ostalim periodima uzorkovanja tokom laktacije, sa izuzetkom vrednosti utvrđenih 280. dana laktacije (25,45 \pm 0,64pg/mL). Naime, koncentracije 17 β -estradiola određene 10. dana (2,84 \pm 0,12 pg/mL), 30. dana (2,89 \pm 0,15 pg/mL), 60. dana (2,99 \pm 0,12 pg/mL), 90. dana laktacije (7,47 \pm 0,28 ng/mL) i 150. dana (9,82 \pm 0,28 pg/mL) su bile statistički značajno niže a koncentracije 180. dana (18,22 \pm 0,51 pg/mL), 210. dana (20,29 \pm 0,35 pg/mL) i 250. dana (26,35 \pm 0,38 pg/mL) laktacije su bile statistički značajno više u odnosu na laktacioni prosek.

Prosečna koncentracija 17 β -estradiola u laktaciji je bila značajno niža nego u komercijalnom mleku sa 3,2% masti dok se nije značajno razlikovala u odnosu na vrednost određenu u komercijalnom mleku sa 1,5% masti. Prosečna koncentracija 17 β -estradiola u laktaciji je bila značajno niža nego vrednost određena u laktofrizu.

5.1.8. Koncentracija masti u mleku

Koncentracija masti u mleku tokom ispitivanih perioda laktacije, kao i laktacioni prosek, koncentracija masti u laktofrizu i komercijalnom mleku sa 1,5 odnosno 3,2 % masti prikazana je u Tabeli 18.

Tabela 18. Koncentracija masti (g/L) u mleku krava

| | X | SE | CV (%) | Min-Max |
|-------------------------|-------|------|--------|-------------|
| 10. dan | 39,74 | 0,93 | 8,78 | 33,00-44,60 |
| 30.dan | 34,11 | 0,76 | 8,31 | 29,10-39,00 |
| 60. dan | 36,61 | 1,13 | 11,58 | 28,90-44,50 |
| 90.dan | 36,97 | 0,79 | 8,08 | 31,60-40,80 |
| 150. dan | 39,37 | 0,95 | 9,08 | 34,10-44,60 |
| 180.dan | 40,40 | 0,96 | 8,92 | 33,30-45,80 |
| 210. dan | 40,42 | 1,07 | 9,88 | 33,20-47,40 |
| 250.dan | 39,38 | 1,03 | 9,77 | 34,50-47,40 |
| 280. dan | 41,66 | 1,29 | 11,51 | 33,90-49,20 |
| Laktacioni prosek | 38,74 | 0,79 | 7,70 | 32,91-42,55 |
| Laktofriz | 37,12 | 0,49 | 5,01 | 34,00-40,00 |
| Komercijalno mleko 1,5% | 15,00 | 0,00 | 0,00 | 15,00-15,00 |
| Komercijalno mleko 3,2% | 32,00 | 0,00 | 0,00 | 32,00-32,00 |

Statistička značajnost razlika u koncentraciji masti u mleku krava između ispitivanih perioda laktacije kao i vrednosti izmerenih u laktofrizu i komercijalnom mleku sa 1,5% odnosno 3,2 % masti prikazana je u Tabeli 19.

Tabela 19. Statistička značajnost razlika (p vrednost) u koncentraciji masti između ispitivanih uzoraka mleka

| | 10.d | 30.d | 60.d | 90.d | 150.d | 180.d | 210.d | 250.d | 280.d | LP | LF | K1,5 |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| K3,2 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| K1,5 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | |
| LF | 0,019 | 0,003 | 0,681 | 0,874 | 0,047 | 0,005 | 0,009 | 0,058 | 0,003 | 0,097 | | |
| LP | 0,422 | 0,000 | 0,135 | 0,129 | 0,617 | 0,196 | 0,218 | 0,625 | 0,064 | | | |
| 280.d | 0,238 | 0,000 | 0,007 | 0,004 | 0,165 | 0,440 | 0,465 | 0,179 | | | | |
| 250.d | 0,799 | 0,000 | 0,081 | 0,007 | 0,992 | 0,478 | 0,490 | | | | | |
| 210.d | 0,636 | 0,000 | 0,021 | 0,016 | 0,470 | 0,988 | | | | | | |
| 180.d | 0,628 | 0,000 | 0,017 | 0,011 | 0,455 | | | | | | | |
| 150.d | 0,783 | 0,000 | 0,073 | 0,064 | | | | | | | | |
| 90.d | 0,032 | 0,015 | 0,795 | | | | | | | | | |
| 60.d | 0,042 | 0,789 | | | | | | | | | | |
| 30.d | 0,000 | | | | | | | | | | | |

Legenda: K3,2-Komercijalno mleko sa 3,2% mlečne masti; K1,5- Komercijalno mleko sa 1,5% mlečne masti; LF-mleko iz laktofriza, LP-laktacioni prosek

Iz tabela se zapaža da je koncentracija masti mleka 10. dana laktacije bila $39,74 \pm 0,93$ g/L, odnosno značajno viša samo od vrednosti utvrđenih 30. 60. i 90. dana laktacije. Najniža vrednost koncentracije masti u mleku utvrđena je 30. dana laktacije ($34,11 \pm 0,76$ g/L), kada je bila statistički značajno niža od vrednosti utvrđenih u svim preostalim danima laktacije izuzev 60. dana laktacije. Šezdestog dana laktacije koncentracija masti u mleku je bila $36,61 \pm 0,79$ g/L odnosno statistički značajno niža u odnosu na vrednosti utvrđene 180., 210. i 280. dana laktacije. Devedesetog dana laktacije koncentracija masti u mleku je iznosila $36,97 \pm 0,79$ g/L i bila je statistički značajno niža od vrednosti utvrđenih u svim narednim periodima laktacije izuzev obne utvrđene 150. dana laktacije. Vrednosti za koncentraciju masti u mleku utvrđene 150., 180., 210., 250. i 280. dana laktacije ($39,37 \pm 0,95$ g/L, $40,40 \pm 0,96$ g/L, $40,42 \pm 1,07$ g/L, $39,38 \pm 1,03$ g/L i $41,66 \pm 1,29$ g/L, pojedinačno) se nisu međusobno značajno razlikovale.

Prosečna koncentracija masti u laktaciji je bila značano različita u odnosu na vrednosti utvrđene u svim ispitivanim periodima, sa izuzetkom vrednosti utvrđenih 10. ($39,74 \pm 0,93$ g/L), 150. ($39,37 \pm 0,95$ g/L) i 250. dana laktacije ($39,38 \pm 1,03$ g/L). U odnosu na vrednost koncentracije masti utvrđenu kao prosečnu vrednost u laktaciji, koncentracije masti su bile značajno niže u 30. ($34,11 \pm 0,76$ g/L), 60. ($36,61 \pm 1,13$ g/L) i 90. danu laktacije ($36,97 \pm 0,79$ g/L) a statistički značajno više u 180. ($40,40 \pm 0,96$ g/L), 210. ($40,42 \pm 1,07$ g/L) i 280. danu laktacije ($41,66 \pm 1,29$ g/L).

Prosečna koncentracija masti u laktaciji je bila značajno viša nego u komercijalnom mleku sa 1,5% masti.

5.1.9. Koncentracija proteina u mleku

Koncentracija proteina u mleku tokom ispitivanih perioda laktacije, kao i laktacioni prosek, koncentracija proteina u laktofrizu i komercijalnom mleku sa 1,5 odnosno 3,2 % masti prikazana je u Tabeli 20.

Tabela 20. Koncentracija proteina (g/L) u mleku krava

| | X | SE | CV (%) | Min-Max |
|-------------------------|-------|------|--------|-------------|
| 10. dan | 32,04 | 0,69 | 8,11 | 27,70-38,20 |
| 30. dan | 30,94 | 0,64 | 7,69 | 27,00-35,40 |
| 60. dan | 31,41 | 0,62 | 7,43 | 27,70-36,20 |
| 90. dan | 31,46 | 0,64 | 7,57 | 27,80-35,90 |
| 150. dan | 31,63 | 0,64 | 7,59 | 27,80-36,00 |
| 180. dan | 32,14 | 0,71 | 8,27 | 27,30-37,70 |
| 210. dan | 33,02 | 0,64 | 7,21 | 28,10-36,70 |
| 250. dan | 32,88 | 0,75 | 8,53 | 28,00-37,00 |
| 280. dan | 33,37 | 0,65 | 7,28 | 28,10-36,70 |
| Laktacioni prosek | 32,09 | 0,59 | 6,94 | 28,34-36,20 |
| Laktofriz | 33,15 | 0,15 | 1,69 | 32,00-34,40 |
| Komercijalno mleko 1,5% | 35,00 | 0,00 | 0,00 | 35,00-35,00 |
| Komercijalno mleko 3,2% | 33,00 | 0,00 | 0,00 | 33,00-33,00 |

Statistička značajnost razlika u koncentraciji proteina u mleku krava između ispitivanih perioda laktacije kao i vrednosti izmerenih u laktofrizu i komercijalnom mleku sa 1,5% odnosno 3,2 % masti prikazana je u Tabeli 21.

Tabela 21. Statistička značajnost razlika (p vrednost) u koncentraciji proteina između ispitivanih uzoraka mleka

| | 10.d | 30.d | 60.d | 90.d | 150.d | 180.d | 210.d | 250.d | 280.d | LP | LF | K1,5 |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| K3,2 | 0,179 | 0,003 | 0,017 | 0,022 | 0,042 | 0,239 | 0,973 | 0,873 | 0,572 | 0,142 | 0,328 | 0,000 |
| K1,5 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,004 | 0,009 | 0,019 | 0,000 | 0,000 | |
| LF | 0,131 | 0,002 | 0,011 | 0,015 | 0,029 | 0,177 | 0,845 | 0,725 | 0,742 | 0,099 | | |
| LP | 0,951 | 0,196 | 0,429 | 0,468 | 0,595 | 0,923 | 0,299 | 0,423 | 0,161 | | | |
| 280.d | 0,174 | 0,013 | 0,038 | 0,045 | 0,067 | 0,213 | 0,703 | 0,623 | | | | |
| 250.d | 0,421 | 0,059 | 0,144 | 0,160 | 0,217 | 0,482 | 0,886 | | | | | |
| 210.d | 0,308 | 0,029 | 0,082 | 0,094 | 0,135 | 0,365 | | | | | | |
| 180.d | 0,920 | 0,219 | 0,443 | 0,478 | 0,596 | | | | | | | |
| 150.d | 0,664 | 0,455 | 0,807 | 0,851 | | | | | | | | |
| 90.d | 0,539 | 0,573 | 0,955 | | | | | | | | | |
| 60.d | 0,502 | 0,607 | | | | | | | | | | |
| 30.d | 0,253 | | | | | | | | | | | |

Legenda: K3,2-Komercijalno mleko sa 3,2% mlečne masti; K1,5- Komercijalno mleko sa 1,5% mlečne masti; LF-mleko iz laktofriza, LP-laktacioni prosek

Iz tabela se zapaža da je koncentracija proteina mleka 10. dana laktacije bila $32,04 \pm 0,69$ g/L i nije se razlikovala od vrednosti utvrđenih u svim ostalim periodima laktacije. Vrednosti utvrđene 30., 60. i 90. dana laktacije ($30,94 \pm 0,64$ g/L, $31,41 \pm 0,62$ g/L i $31,46 \pm 0,64$ g/L) se takođe nisu razlikovale od vrednosti utvrđenih u ostalim periodima laktacije izuzev u odnosu na vrednost određenu 280. dana kada je koncentracija proteina u mleku ($33,37 \pm 0,65$ g/L) bila statistički značajno viša. Dodatno vrednost utvrđena 30. dana laktacije je bila statistički značajno niža u odnosu na vrednost utvrđenu 210. dana laktacije. Vrednosti za koncentraciju proteina u mleku utvrđene 150., 180., 210., 250. i 280. dana laktacije ($31,63 \pm 0,64$ g/L, $32,14 \pm 0,71$ g/L, $33,02 \pm 0,64$ g/L, $32,88 \pm 0,75$ g/L i $33,37 \pm 0,65$ g/L, pojedinačno) se nisu međusobno značajno razlikovale.

Iz tabele se zapaža da je prosečna koncentracija proteina u laktaciji bila značano različita u odnosu na vrednosti utvrđene u svim ispitivanim periodima, sa izuzetkom vrednosti utvrđenih 180. dana

laktacije ($32,14 \pm 0,71$ g/L). U odnosu na vrednost koncentracije proteina utvrđenu kao prosečnu vrednost u laktaciji, koncentracije proteina su bile značajno niže u 30. ($30,94 \pm 0,64$ g/L), 60. ($31,41 \pm 0,62$ g/L), 90. ($31,46 \pm 0,64$ g/L) i 150. danu laktacije ($31,63 \pm 0,64$ g/L) a statistički značajno više u 210. ($33,02 \pm 0,64$ g/L), 250. ($32,88 \pm 0,75$ g/L) i 280. danu laktacije ($33,37 \pm 0,65$ g/L).

Prosečna koncentracija proteina u laktaciji je bila značajno niža nego u komercijalnom mleku sa 1,5% masti.

5.2. Promene u koncentracijama insulina i različitih biohemijskih parametara u krvi ispitivanih krava

5.2.1. Koncentracija insulina

Koncentracija insulina u krvi krava tokom ispitivanih perioda laktacije, kao i prosečna vrednost tokom laktacije prikazana je u Tabeli 22.

Tabela 22. Koncentracija insulina ($\mu\text{U/mL}$) u krvi krava

| | X | SE | CV (%) | Min-Max |
|-------------------|-------|------|--------|-------------|
| 10. dan | 17,41 | 0,99 | 21,29 | 12,69-22,91 |
| 30.dan | 18,29 | 0,68 | 14,02 | 14,23-23,16 |
| 60. dan | 21,63 | 1,41 | 24,39 | 16,46-33,67 |
| 90.dan | 21,92 | 0,53 | 9,18 | 19,59-25,56 |
| 150. dan | 22,94 | 1,39 | 22,72 | 17,49-37,75 |
| 180.dan | 23,20 | 0,90 | 14,57 | 18,24-30,01 |
| 210. dan | 24,48 | 1,35 | 20,58 | 18,98-33,69 |
| 250.dan | 25,36 | 1,99 | 29,32 | 14,28-38,49 |
| 280. dan | 27,67 | 1,98 | 26,79 | 14,51-40,24 |
| Laktacioni prosek | 22,55 | 0,62 | 10,33 | 18,79-28,28 |

Statistička značajnost razlika u koncentraciji insulina u krvi krava uključujući I laktacioni prosek prikazana je u Tabeli 22.

Tabela 23. Statistička značajnost razlika (p vrednost) u koncentraciji insulina između ispitivanih uzoraka krvi

| | 10.d | 30.d | 60.d | 90.d | 150.d | 180.d | 210.d | 250.d | 280.d |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|-------|-------|-------|--------------|
| LP | 0,000 | 0,000 | 0,556 | 0,453 | 0,797 | 0,552 | 0,715 | 0,188 | 0,020 |
| 280.d | 0,000 | 0,000 | 0,019 | 0,009 | 0,061 | 0,050 | 0,193 | 0,417 | |
| 250.d | 0,001 | 0,002 | 0,137 | 0,106 | 0,328 | 0,333 | 0,715 | | |
| 210.d | 0,000 | 0,000 | 0,156 | 0,089 | 0,436 | 0,442 | | | |
| 180.d | 0,000 | 0,000 | 0,354 | 0,231 | 0,874 | | | | |
| 150.d | 0,003 | 0,006 | 0,512 | 0,499 | | | | | |
| 90.d | 0,000 | 0,000 | 0,848 | | | | | | |
| 60.d | 0,021 | 0,043 | | | | | | | |
| 30.d | 0,467 | | | | | | | | |

Legenda: LP-laktacioni prosek

Koncentracija insulina je kontinuirano rasla od 10. do 280. dana laktacije sa značajnim porastom između 30. i 60. dana. Naime, koncentracije insulina u krvi utvrđene 10. i 30. dana laktacije ($17,41 \pm 0,99$ $\mu\text{U/mL}$ i $18,29 \pm 0,68$ $\mu\text{U/mL}$, pojedinačno) se nisu međusobno značajno razlikovale ali su bile, pojedinačno, značajno niže od vrednosti koncentracija insulina u krvi utvrđenih u svim narednim

periodima laktacije. Šezdesetog i devedesetog dana laktacije koncentracije insulina u krvi ($21,63 \pm 1,41$ $\mu\text{U/mL}$ i $21,92 \pm 0,53$ $\mu\text{U/mL}$, pojedinačno) su bile značajno niže samo od vrednosti utvrđenih 280. dana laktacije, pojedinačno. Vrednosti koncentracija insulina utvrđenih 150., 180., 210., 250. i 280. dana laktacije ($22,94 \pm 1,39$ $\mu\text{U/mL}$, $23,20 \pm 0,90$ $\mu\text{U/mL}$, $24,48 \pm 1,35$ $\mu\text{U/mL}$, $25,36 \pm 1,99$ $\mu\text{U/mL}$ i $27,67 \pm 1,98$ $\mu\text{U/mL}$, pojedinačno) se nisu međusobno značajno razlikovale.

5.2.2 Koncentracija glukoze

Koncentracija glukoze u krvi krava tokom ispitivanih perioda laktacije, kao i prosečna vrednost tokom laktacije prikazana je u Tabeli 24.

Tabela 24. Koncentracija glukoze (mmol/L) u krvi krava

| | X | SE | CV (%) | Min-Max |
|-------------------|------|------|--------|-----------|
| 10. dan | 3,12 | 0,20 | 23,71 | 1,60-4,50 |
| 30. dan | 2,85 | 0,22 | 28,53 | 1,20-4,30 |
| 60. dan | 3,43 | 0,16 | 17,78 | 2,40-4,70 |
| 90. dan | 3,69 | 0,10 | 10,59 | 3,00-4,50 |
| 150. dan | 3,78 | 0,17 | 16,58 | 2,10-4,70 |
| 180. dan | 3,83 | 0,14 | 14,04 | 2,50-4,80 |
| 210. dan | 3,86 | 0,12 | 11,99 | 2,60-4,30 |
| 250. dan | 3,68 | 0,08 | 8,67 | 2,90-4,20 |
| 280. dan | 3,94 | 0,09 | 8,59 | 3,30-4,40 |
| Laktacioni prosek | 3,58 | 0,08 | 8,35 | 2,94-3,95 |

Statistička značajnost razlika u koncentraciji glukoze u krvi krava između ispitivanih perioda laktacije uključujući i laktacioni prosek prikazana je u Tabeli 25.

Tabela 25. Statistička značajnost razlika (p vrednost) u koncentraciji glukoze između ispitivanih uzoraka krvi

| | 10.d | 30.d | 60.d | 90.d | 150.d | 180.d | 210.d | 250.d | 280.d |
|-------|--------------|--------------|--------------|-------|-------|-------|-------|--------------|--------------|
| LP | 0,042 | 0,004 | 0,441 | 0,389 | 0,289 | 0,129 | 0,063 | 0,396 | 0,005 |
| 280.d | 0,001 | 0,000 | 0,011 | 0,082 | 0,396 | 0,534 | 0,613 | 0,043 | |
| 250.d | 0,017 | 0,001 | 0,199 | 0,916 | 0,599 | 0,356 | 0,228 | | |
| 210.d | 0,004 | 0,000 | 0,046 | 0,299 | 0,684 | 0,881 | | | |
| 180.d | 0,007 | 0,001 | 0,078 | 0,429 | 0,798 | | | | |
| 150.d | 0,018 | 0,002 | 0,155 | 0,668 | | | | | |
| 90.d | 0,017 | 0,002 | 0,196 | | | | | | |
| 60.d | 0,231 | 0,041 | | | | | | | |
| 30.d | 0,364 | | | | | | | | |

Legenda: LP-laktacioni prosek

Koncentracija glukoze utvrđena 10. dana laktacije je bila $3,12 \pm 0,20$ mmol/L, odnosno značajno niža od vrednosti utvrđenih u svim narednim periodima laktacije, izuzev u odnosu na vrednosti utvrđene 30. i 60. dana laktacije, dok je koncentracija glukoze utvrđena 30. dana laktacije bila najniža ($2,85 \pm 0,22$ mmol/L), odnosno značajno niža od vrednosti utvrđenim u krvi u svim ostalim periodima laktacije. Koncentracija glukoze u krvi krava 60. dana laktacije je bila $3,43 \pm 0,16$ mmol/L i bila je statistički značajno niža u odnosu na vrednosti utvrđene 210. i 280. dana laktacije. Vrednosti koncentracija insulina utvrđenih 90., 150., 180., 210., 250. i 280. dana laktacije ($3,69 \pm 0,10$ mmol/L, $3,78 \pm 0,17$ mmol/L, $3,83 \pm 0,14$ mmol/L, $3,86 \pm 0,12$ mmol/L, $3,68 \pm 0,08$ mmol/L i $3,94 \pm 0,09$ mmol/L,

pojedinačno) se nisu međusobno značajno razlikovale izuzev između vrednosti utvrđenih 250. i 280. dana laktacije jer je vrednost utvrđena 280. dana bila statistički značajno viša od vrednosti utvrđene 250. dana.

5.2.3. Koncentracija ukupnih proteina

Koncentracija ukupnih proteina u krvi krava tokom ispitivanih perioda laktacije, kao i prosečna vrednost tokom laktacije prikazana je u Tabeli 26.

Tabela 26. Koncentracija ukupnih proteina (g/L) u krvi krava

| | X | SE | CV (%) | Min-Max |
|-------------------|-------|------|--------|-------------|
| 10. dan | 69,40 | 2,04 | 11,00 | 55,40-81,20 |
| 30. dan | 78,97 | 1,55 | 7,32 | 68,10-88,00 |
| 60. dan | 78,66 | 1,29 | 6,13 | 72,50-86,00 |
| 90. dan | 80,33 | 1,53 | 7,11 | 68,10-86,90 |
| 150. dan | 89,19 | 1,86 | 8,59 | 72,10-96,60 |
| 180. dan | 81,90 | 1,26 | 5,78 | 74,50-90,60 |
| 210. dan | 81,43 | 1,18 | 5,42 | 74,60-90,60 |
| 250. dan | 83,05 | 1,26 | 5,67 | 70,60-90,20 |
| 280. dan | 85,61 | 1,51 | 6,60 | 73,40-94,00 |
| Laktacioni prosek | 80,06 | 0,82 | 3,83 | 73,64-85,17 |

Statistička značajnost razlika u koncentraciji ukupnih proteina u krvi krava između ispitivanih perioda laktacije uključujući i laktacioni prosek prikazana je u Tabeli 27.

Tabela 27. Statistička značajnost razlika (p vrednost) u koncentraciji ukupnih proteina između ispitivanih uzoraka krvi

| | 10.d | 30.d | 60.d | 90.d | 150.d | 180.d | 210.d | 250.d | 280.d |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|-------|--------------|-------|--------------|
| LP | 0,000 | 0,539 | 0,366 | 0,879 | 0,583 | 0,233 | 0,348 | 0,057 | 0,003 |
| 280.d | 0,000 | 0,005 | 0,002 | 0,021 | 0,077 | 0,071 | 0,038 | 0,204 | |
| 250.d | 0,000 | 0,052 | 0,022 | 0,181 | 0,416 | 0,525 | 0,358 | | |
| 210.d | 0,000 | 0,216 | 0,124 | 0,571 | 0,913 | 0,790 | | | |
| 180.d | 0,000 | 0,154 | 0,084 | 0,435 | 0,756 | | | | |
| 150.d | 0,000 | 0,367 | 0,237 | 0,723 | | | | | |
| 90.d | 0,000 | 0,538 | 0,410 | | | | | | |
| 60.d | 0,001 | 0,877 | | | | | | | |
| 30.d | 0,001 | | | | | | | | |

Legenda: LP-laktacioni prosek

Koncentracija ukupnih proteina utvrđena 10. dana laktacije je bila $69,40 \pm 2,04$ g/L, odnosno bila je značajno niža od vrednosti utvrđenih u svim narednim periodima laktacije. Vrednosti utvrđene 30., 60., 90., 150., 180., 210., 250. i 280. dana laktacije ($78,97 \pm 1,55$ g/L, $78,66 \pm 1,29$ g/L, $80,33 \pm 1,53$ g/L, $89,19 \pm 1,86$ g/L, $81,90 \pm 1,26$ g/L, $81,43 \pm 1,18$ g/L, $83,05 \pm 1,26$ g/L i $85,61 \pm 1,51$ g/L, pojedinačno) se nisu međusobno značajno razlikovale izuzev između vrednosti utvrđenih 30., 60. 90. i 210. dana u poređenju sa vrednosti utvrđene 280. dana laktacije, kao i između vrednosti utvrđenih 60. i 250. dana laktacije.

5.2.4. Koncentracija albumina

Koncentracija albumina u krvi krava tokom ispitivanih perioda laktacije, kao i prosečna vrednost tokom laktacije prikazana je u Tabeli 28.

Tabela 28 Koncentracija albumina (g/L) u krvi krava

| | X | SE | CV (%) | Min-Max |
|-------------------|-------|------|--------|-------------|
| 10. dan | 32,39 | 1,95 | 13,81 | 25,60-40,30 |
| 30. dan | 36,38 | 1,65 | 16,97 | 18,80-44,60 |
| 60. dan | 38,69 | 0,78 | 7,58 | 33,00-43,60 |
| 90. dan | 39,89 | 1,08 | 10,16 | 33,40-47,20 |
| 150. dan | 41,33 | 0,94 | 8,47 | 36,40-50,20 |
| 180. dan | 41,53 | 0,83 | 7,53 | 38,00-49,40 |
| 210. dan | 41,08 | 1,23 | 11,23 | 34,20-51,20 |
| 250. dan | 41,61 | 1,13 | 10,13 | 33,50-48,60 |
| 280. dan | 42,19 | 0,64 | 5,69 | 38,30-46,10 |
| Laktacioni prosek | 39,45 | 0,49 | 4,72 | 35,67-43,09 |

Statistička značajnost razlika u koncentraciji albumina u krvi krava između ispitivanih perioda laktacije uključujući i laktacioni prosek prikazana je u Tabeli 29.

Tabela 29. Statistička značajnost razlika (p vrednost) u koncentraciji albumina između ispitivanih uzoraka krvi

| | 10.d | 30.d | 60.d | 90.d | 150.d | 180.d | 210.d | 250.d | 280.d |
|-------|--------------|--------------|--------------|-------|-------|--------------|-------|-------|--------------|
| LP | 0,000 | 0,087 | 0,415 | 0,725 | 0,088 | 0,043 | 0,233 | 0,091 | 0,002 |
| 280.d | 0,000 | 0,003 | 0,002 | 0,077 | 0,457 | 0,534 | 0,430 | 0,659 | |
| 250.d | 0,000 | 0,015 | 0,042 | 0,277 | 0,851 | 0,952 | 0,751 | | |
| 210.d | 0,000 | 0,031 | 0,114 | 0,471 | 0,869 | 0,765 | | | |
| 180.d | 0,000 | 0,009 | 0,019 | 0,239 | 0,879 | | | | |
| 150.d | 0,000 | 0,015 | 0,039 | 0,318 | | | | | |
| 90.d | 0,000 | 0,089 | 0,380 | | | | | | |
| 60.d | 0,000 | 0,219 | | | | | | | |
| 30.d | 0,061 | | | | | | | | |

Legenda: LP-laktacioni prosek

Koncentracija albumina utvrđena 10. dana laktacije je bila $32,39 \pm 1,95$ g/L, odnosno bila je značajno niža od vrednosti utvrđenih u svim narednim periodima laktacije. Vrednosti utvrđene 30. dana laktacije ($36,38 \pm 1,65$ g/L) bile su značajno niže od vrednosti utvrđenih u svim narednim periodima laktacije, dok su vrednosti utvrđene 60. dana laktacije ($38,69 \pm 0,78$ g/L) bile značajno niže od vrednosti utvrđenih u svim narednim periodima laktacije izuzev 90. i 210. dana laktacije. Vrednosti utvrđene 90., 150., 180., 210., 250. i 280. dana laktacije ($39,89 \pm 1,08$ g/L, $41,33 \pm 0,94$ g/L, $41,53 \pm 0,83$ g/L, $41,08 \pm 1,23$ g/L, $41,61 \pm 1,13$ g/L i $42,19 \pm 0,64$ g/L) se nisu međusobno značajno razlikovale.

5.2.5. Koncentracija uree

Koncentracija uree u krvi krava tokom ispitivanih perioda laktacije, kao i prosečna vrednost tokom laktacije prikazana je u Tabeli 30.

Tabela 30. Koncentracija uree (mmol/L) u krvi krava

| | X | SE | CV (%) | Min-Max |
|-------------------|------|------|--------|-----------|
| 10. dan | 4,17 | 0,16 | 14,46 | 2,90-5,30 |
| 30.dan | 4,38 | 0,15 | 13,08 | 3,60-5,30 |
| 60. dan | 5,23 | 0,22 | 16,05 | 3,60-6,70 |
| 90.dan | 5,90 | 0,25 | 16,16 | 4,80-7,60 |
| 150. dan | 6,43 | 0,29 | 16,98 | 4,90-8,80 |
| 180.dan | 6,56 | 0,25 | 15,72 | 5,40-8,50 |
| 210. dan | 6,79 | 0,30 | 16,87 | 5,40-9,00 |
| 250.dan | 6,90 | 0,31 | 17,08 | 5,50-9,10 |
| 280. dan | 6,88 | 0,30 | 16,36 | 5,20-9,30 |
| Laktacioni prosek | 5,92 | 0,19 | 12,39 | 5,04-7,23 |

Statistička značajnost razlika u koncentraciji uree u krvi krava između ispitivanih perioda laktacije uključujući i laktacioni prosek prikazana je u Tabeli 31.

Tabela 31. Statistička značajnost razlika (p vrednost) u koncentraciji uree između ispitivanih uzoraka krvi

| | 10.d | 30.d | 60.d | 90.d | 150.d | 180.d | 210.d | 250.d | 280.d |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|-------|--------------|--------------|--------------|
| LP | 0,000 | 0,000 | 0,031 | 0,959 | 0,157 | 0,067 | 0,023 | 0,013 | 0,013 |
| 280.d | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,019 | 0,293 | 0,448 | 0,843 | 0,961 | |
| 250.d | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,020 | 0,282 | 0,429 | 0,809 | | |
| 210.d | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,034 | 0,397 | 0,584 | | | |
| 180.d | 0,000 | 0,000 | 0,001 | 0,088 | 0,738 | | | | |
| 150.d | 0,000 | 0,000 | 0,003 | 0,184 | | | | | |
| 90.d | 0,000 | 0,000 | 0,062 | | | | | | |
| 60.d | 0,001 | 0,004 | | | | | | | |
| 30.d | 0,359 | | | | | | | | |

Legenda: LP-laktacioni prosek

Koncentracije uree utvrđene 10., 30. i 60. dana laktacije ($4,17 \pm 0,16$ mmol/L, $4,38 \pm 0,15$ mmol/L i $5,23 \pm 0,22$ mmol/L) su bile značajno niže od vrednosti utvrđenih u svim narednim periodima laktacije izuzev u slučajevima poređenja koncentracije uree 30. i 60. odnosno 60. i 90. dana laktacije. Koncentracije uree utvrđena 90. dana laktacije ($5,90 \pm 0,25$ mmol/L) je bila značajno niža od vrednosti utvrđenih u kasnijim periodima laktacije izuzev u odnosu na 150. i 180. dan laktacije. Vrednosti utvrđene 150., 180., 210., 250. i 280. dana laktacije ($6,43 \pm 0,29$ mmol/L, $6,56 \pm 0,25$ mmol/L, $6,79 \pm 0,30$ mmol/L, $6,90 \pm 0,31$ mmol/L i $6,88 \pm 0,30$ mmol/L) se nisu međusobno značajno razlikovale.

5.2.6. Koncentracija ukupnog bilirubina

Koncentracija ukupnog bilirubina u krvi krava tokom ispitivanih perioda laktacije, kao i prosečna vrednost tokom laktacije prikazana je u Tabeli 32.

Tabela 32. Koncentracija ukupnog bilirubina ($\mu\text{mol/L}$) u krvi krava

| | X | SE | CV (%) | Min-Max |
|-------------------|------|------|--------|------------|
| 10. dan | 8,42 | 0,28 | 12,66 | 7,00-10,30 |
| 30. dan | 7,54 | 0,13 | 6,65 | 6,90-8,30 |
| 60. dan | 7,71 | 0,08 | 3,83 | 7,20-8,10 |
| 90. dan | 7,47 | 0,09 | 4,94 | 7,00-8,50 |
| 150. dan | 7,49 | 0,08 | 4,23 | 7,10-8,10 |
| 180. dan | 6,20 | 0,32 | 19,15 | 4,50-8,30 |
| 210. dan | 5,86 | 0,26 | 16,51 | 4,20-7,50 |
| 250. dan | 5,89 | 0,28 | 18,07 | 3,90-7,30 |
| 280. dan | 5,58 | 0,23 | 15,57 | 3,90-6,80 |
| Laktacioni prosek | 6,91 | 0,07 | 4,03 | 6,42-7,35 |

Statistička značajnost razlika u koncentraciji ukupnog bilirubina u krvi krava između ispitivanih perioda laktacije uključujući i laktacioni prosek prikazana je u Tabeli 33.

Tabela 33. Statistička značajnost razlika (p vrednost) u koncentraciji ukupnog bilirubina između ispitivanih uzoraka krvi

| | 10.d | 30.d | 60.d | 90.d | 150.d | 180.d | 210.d | 250.d | 280.d |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| LP | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,039 | 0,000 | 0,002 | 0,000 |
| 280.d | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,409 | 0,442 | 0,411 | |
| 250.d | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,478 | 0,927 | | |
| 210.d | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,409 | | | |
| 180.d | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | |
| 150.d | 0,004 | 0,755 | 0,067 | 0,870 | | | | | |
| 90.d | 0,004 | 0,671 | 0,065 | | | | | | |
| 60.d | 0,024 | 0,280 | | | | | | | |
| 30.d | 0,009 | | | | | | | | |

Legenda: LP-laktacioni prosek

Koncentracija ukupnog bilirubina utvrđena 10. dana laktacije je bila $8,42 \pm 0,28 \mu\text{mol/L}$, odnosno bila je značajno viša od vrednosti utvrđenih u svim narednim periodima laktacije. Vrednosti za koncentraciju ukupnog bilirubina u krvi utvrđene 30., 60., 90. i 150 dana laktacije ($7,54 \pm 0,13 \mu\text{mol/L}$, $7,71 \pm 0,08 \mu\text{mol/L}$, $7,47 \pm 0,09 \mu\text{mol/L}$ i $7,49 \pm 0,08 \mu\text{mol/L}$, pojedinačno) bile su značajno više od vrednosti utvrđenih 180., 210., 250. i 280. dana laktacije. Vrednosti utvrđene 180., 210., 250. i 280. dana laktacije ($6,20 \pm 0,32 \mu\text{mol/L}$, $5,86 \pm 0,26 \mu\text{mol/L}$, $5,89 \pm 0,28 \mu\text{mol/L}$, $5,58 \pm 0,23 \mu\text{mol/L}$, pojedinačno) se nisu međusobno statistički značajno razlikovale.

5.2.7. Aktivnost ALTa

Aktivnost ALT u krvi krava tokom ispitivanih perioda laktacije, kao i prosečna vrednost tokom laktacije prikazana je u Tabeli 34.

Tabela 34 Aktivnost ALT (U/L) u krvi krava

| | X | SE | CV (%) | Min-Max |
|-------------------|-------|------|--------|-------------|
| 10. dan | 36,40 | 2,07 | 21,26 | 21,00-46,30 |
| 30. dan | 43,43 | 0,99 | 8,56 | 37,20-50,60 |
| 60. dan | 46,51 | 0,97 | 7,81 | 40,20-53,20 |
| 90. dan | 46,51 | 0,79 | 6,38 | 42,80-52,30 |
| 150. dan | 48,27 | 0,94 | 7,30 | 42,20-56,20 |
| 180. dan | 48,53 | 0,82 | 6,34 | 41,50-53,80 |
| 210. dan | 47,84 | 0,91 | 7,11 | 40,20-54,20 |
| 250. dan | 48,74 | 0,81 | 6,23 | 44,50-55,00 |
| 280. dan | 49,63 | 0,81 | 6,14 | 45,90-55,40 |
| Laktacioni prosek | 46,20 | 0,59 | 4,82 | 42,32-49,99 |

Statistička značajnost razlika u aktivnosti ALT u krvi krava između ispitivanih perioda laktacije uključujući i laktacioni prosek prikazana je u Tabeli 35.

Tabela 35. Statistička značajnost razlika (p vrednost) u aktivnosti ALT između ispitivanih uzoraka krvi

| | 10.d | 30.d | 60.d | 90.d | 150.d | 180.d | 210.d | 250.d | 280.d |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|--------------|
| LP | 0,000 | 0,024 | 0,790 | 0,760 | 0,076 | 0,031 | 0,144 | 0,018 | 0,002 |
| 280.d | 0,000 | 0,000 | 0,021 | 0,011 | 0,286 | 0,351 | 0,155 | 0,448 | |
| 250.d | 0,000 | 0,000 | 0,090 | 0,060 | 0,708 | 0,854 | 0,467 | | |
| 210.d | 0,000 | 0,003 | 0,327 | 0,281 | 0,746 | 0,581 | | | |
| 180.d | 0,000 | 0,000 | 0,126 | 0,898 | 0,839 | | | | |
| 150.d | 0,000 | 0,001 | 0,205 | 0,165 | | | | | |
| 90.d | 0,000 | 0,023 | 1,000 | | | | | | |
| 60.d | 0,000 | 0,036 | | | | | | | |
| 30.d | 0,005 | | | | | | | | |

Legenda: LP-laktacioni prosek

Aktivnosti ALT utvrđene 10. i 30. dana laktacije bile su $36,40 \pm 2,07$ U/L i $43,43 \pm 0,99$ U/L, pojedinačno, odnosno značajno niže od vrednosti utvrđenih u svim narednim periodima laktacije. Vrednosti za aktivnost ALT u krvi utvrđene 60. i 90. dana laktacije ($46,51 \pm 0,79$ U/L i $46,51 \pm 0,79$ U/L, pojedinačno) bile su značajno niže samo od vrednosti utvrđene 280. dana laktacije. Vrednosti utvrđene 150., 180. 210. 250. i 280. dana laktacije ($48,27 \pm 0,94$ U/L, $48,53 \pm 0,82$ U/L, $47,84 \pm 0,91$ U/L, $48,74 \pm 0,81$ U/L i $49,63 \pm 0,81$ U/L, pojedinačno) se nisu međusobno statistički značajno razlikovale.

5.2.8. Aktivnost ASTa

Aktivnost AST u krvi krava tokom ispitivanih perioda laktacije, kao i prosečna vrednost tokom laktacije prikazana je u Tabeli 36.

Tabela 36 Aktivnost AST (U/L) u krvi krava

| | X | SE | CV (%) | Min-Max |
|-------------------|--------|-------|--------|--------------|
| 10. dan | 82,62 | 5,57 | 25,36 | 64,50-143,20 |
| 30.dan | 83,10 | 4,72 | 21,24 | 54,50-120,40 |
| 60. dan | 100,23 | 10,14 | 37,85 | 63,80-199,20 |
| 90.dan | 107,75 | 9,20 | 31,96 | 66,80-188,70 |
| 150. dan | 109,96 | 8,08 | 27,49 | 69,70-177,00 |
| 180.dan | 112,53 | 7,26 | 24,13 | 75,60-178,50 |
| 210. dan | 113,73 | 7,52 | 24,76 | 77,60-189,00 |
| 250.dan | 114,55 | 7,63 | 24,92 | 79,50-190,00 |
| 280. dan | 117,32 | 7,23 | 23,04 | 88,20-178,00 |
| Laktacioni prosek | 104,64 | 5,18 | 18,78 | 75,74-152,30 |

Statistička značajnost razlika u aktivnosti AST u krvi krava između ispitivanih perioda laktacije uključujući i laktacioni prosek prikazana je u Tabeli 37.

Tabela 37. Statistička značajnost razlika (p vrednost) u aktivnosti AST između ispitivanih uzoraka krvi

| | 10.d | 30.d | 60.d | 90.d | 150.d | 180.d | 210.d | 250.d | 280.d |
|-------|--------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| LP | 0,012 | 0,001 | 0,737 | 0,733 | 0,548 | 0,354 | 0,303 | 0,268 | 0,150 |
| 280.d | 0,001 | 0,001 | 0,182 | 0,421 | 0,503 | 0,644 | 0,733 | 0,794 | |
| 250.d | 0,003 | 0,002 | 0,269 | 0,574 | 0,682 | 0,849 | 0,939 | | |
| 210.d | 0,004 | 0,002 | 0,295 | 0,619 | 0,735 | 0,910 | | | |
| 180.d | 0,004 | 0,002 | 0,333 | 0,686 | 0,814 | | | | |
| 150.d | 0,012 | 0,008 | 0,460 | 0,858 | | | | | |
| 90.d | 0,034 | 0,025 | 0,588 | | | | | | |
| 60.d | 0,164 | 0,137 | | | | | | | |
| 30.d | 0,929 | | | | | | | | |

Legenda: LP-laktacioni prosek

Aktivnosti AST utvrđene 10. i 30. dana laktacije bile su $82,62 \pm 5,57$ U/L i $83,10 \pm 4,72$ U/L, pojedinačno, odnosno značajno niže od vrednosti utvrđenih od 90. do 280. dana laktacije. Vrednosti za aktivnost ALT u krvi 60., 90., 150., 180. 210. 250. i 280. dana laktacije ($100,23 \pm 10,14$ U/L, $107,75 \pm 9,20$ U/L, $109,96 \pm 8,08$ U/L, $112,53 \pm 7,26$ U/L, $113,73 \pm 7,52$ U/L, $114,55 \pm 7,63$ U/L i $117,32 \pm 7,23$, pojedinačno) se nisu međusobno statistički značajno razlikovale. Numerički, aktivnost ASTa je kontinuirano rasla od 10. do 280. dana laktacije.

5.2.9. Koncentracija kalcijuma

Koncentracija kalcijuma u krvi krava tokom ispitivanih perioda laktacije, kao i prosečna vrednost tokom laktacije prikazana je u Tabeli 38.

Tabela 38. Koncentracija kalcijuma (mmol/L) u krvi krava

| | X | SE | CV (%) | Min-Max |
|-------------------|------|------|--------|-----------|
| 10. dan | 2,22 | 0,05 | 7,96 | 1,91-2,60 |
| 30.dan | 2,29 | 0,05 | 8,61 | 2,02-2,55 |
| 60. dan | 2,55 | 0,05 | 7,68 | 2,11-2,85 |
| 90.dan | 2,58 | 0,07 | 9,57 | 2,26-3,17 |
| 150. dan | 2,64 | 0,08 | 10,77 | 2,10-3,12 |
| 180.dan | 2,65 | 0,07 | 10,70 | 2,10-3,00 |
| 210. dan | 2,66 | 0,07 | 10,01 | 2,10-3,10 |
| 250.dan | 2,69 | 0,09 | 12,21 | 2,12-3,25 |
| 280. dan | 2,71 | 0,09 | 12,89 | 2,00-3,33 |
| Laktacioni prosek | 2,56 | 0,03 | 5,03 | 2,31-2,75 |

Statistička značajnost razlika u koncentraciji kalcijuma u krvi krava između ispitivanih perioda laktacije uključujući i laktacioni prosek prikazana je u Tabeli 39.

Tabela 39. Statistička značajnost razlika (p vrednost) u koncentraciji kalcijuma između ispitivanih uzoraka krvi

| | 10.d | 30.d | 60.d | 90.d | 150.d | 180.d | 210.d | 250.d | 280.d |
|-------|--------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| LP | 0,000 | 0,000 | 0,966 | 0,731 | 0,325 | 0,292 | 0,192 | 0,144 | 0,130 |
| 280.d | 0,000 | 0,001 | 0,152 | 0,267 | 0,556 | 0,587 | 0,676 | 0,912 | |
| 250.d | 0,000 | 0,001 | 0,169 | 0,300 | 0,619 | 0,653 | 0,750 | | |
| 210.d | 0,000 | 0,000 | 0,230 | 0,418 | 0,833 | 0,876 | | | |
| 180.d | 0,000 | 0,001 | 0,326 | 0,532 | 0,957 | | | | |
| 150.d | 0,000 | 0,001 | 0,358 | 0,570 | | | | | |
| 90.d | 0,000 | 0,002 | 0,737 | | | | | | |
| 60.d | 0,000 | 0,002 | | | | | | | |
| 30.d | | 0,290 | | | | | | | |

Legenda: LP-laktacioni prosek

Koncentracije kalcijuma utvrđene 10. i 30 dana laktacije bile su $2,22 \pm 0,05$ mmol/L i $2,29 \pm 0,05$, pojedinačno, i nisu se značajno međusobno razlikovale ali su bile značajno niže u odnosu na vrednosti utvrđene u svim narednim periodima laktacije. Vrednosti za koncentraciju kalcijuma u krvi utvrđene 60., 90., 150., 180., 210., 250. i 280 dana laktacije ($2,55 \pm 0,05$ mmol/L, $2,58 \pm 0,07$ mmol/L, $2,64 \pm 0,08$ mmol/L, $2,65 \pm 0,07$ mmol/L, $2,66 \pm 0,07$ mmol/L, $2,69 \pm 0,09$ mmol/L i $2,71 \pm 0,09$ mmol/L, pojedinačno) se nisu međusobno statistički značajno razlikovale.

5.2.10. Koncentracija fosfora

Koncentracija fosfora u krvi krava tokom ispitivanih perioda laktacije, kao i prosečna vrednost tokom laktacije prikazana je u Tabeli 40.

Tabela 40. Koncentracija fosfora (mmol/L) u krvi krava

| | X | SE | CV (%) | Min-Max |
|-------------------|------|------|--------|-----------|
| 10. dan | 1,64 | 0,12 | 28,22 | 0,99-2,37 |
| 30.dan | 1,84 | 0,18 | 23,23 | 0,96-2,43 |
| 60. dan | 1,91 | 0,06 | 11,58 | 1,46-2,23 |
| 90.dan | 1,97 | 0,07 | 12,58 | 1,65-2,38 |
| 150. dan | 2,25 | 0,11 | 19,56 | 1,35-3,28 |
| 180.dan | 2,25 | 0,12 | 20,08 | 1,39-3,33 |
| 210. dan | 2,30 | 0,12 | 19,77 | 1,45-3,34 |
| 250.dan | 2,33 | 0,08 | 13,35 | 1,50-2,80 |
| 280. dan | 2,39 | 0,09 | 13,67 | 1,60-2,96 |
| Laktacioni prosek | 2,09 | 0,05 | 9,34 | 1,68-2,38 |

Statistička značajnost razlika u koncentraciji fosfora u krvi krava između ispitivanih perioda laktacije uključujući i laktacioni prosek prikazana je u Tabeli 41.

Tabela 41. Statistička značajnost razlika (p vrednost) u koncentraciji fosfora između ispitivanih uzoraka krvi

| | 10.d | 30.d | 60.d | 90.d | 150.d | 180.d | 210.d | 250.d | 280.d |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|-------|-------|--------------|--------------|
| LP | 0,003 | 0,055 | 0,033 | 0,152 | 0,229 | 0,243 | 0,455 | 0,022 | 0,007 |
| 280.d | 0,000 | 0,001 | 0,000 | 0,001 | 0,358 | 0,361 | 0,455 | 0,644 | |
| 250.d | 0,000 | 0,002 | 0,000 | 0,002 | 0,580 | 0,580 | 0,455 | | |
| 210.d | 0,001 | 0,010 | 0,008 | 0,024 | 0,770 | 0,766 | | | |
| 180.d | 0,002 | 0,021 | 0,019 | 0,051 | 0,993 | | | | |
| 150.d | 0,001 | 0,019 | 0,017 | 0,046 | | | | | |
| 90.d | 0,030 | 0,341 | 0,552 | | | | | | |
| 60.d | 0,061 | 0,569 | | | | | | | |
| 30.d | 0,258 | | | | | | | | |

Legenda: LP-laktacioni prosek

Koncentracije fosfora utvrđene 10., 30. i 60 dana laktacije bile su $1,64 \pm 0,12$ mmol/L, $1,84 \pm 0,18$ mmol/L i $1,91 \pm 0,06$ mmol/L, pojedinačno i bile su značajno niže u odnosu na vrednosti utvrđene od 150. do 280. dana laktacije. Dodatno, vrednost utvrđena 30. dana laktacije bila je značajno niža od koncentracije fosfora utvrđene 90. dana laktacije. Koncentracija fosfora utvrđena 90. dana laktacije ($1,97 \pm 0,07$ mmol/L) bila je značajno niža od vrednosti utvrđenih u kasnijim periodima laktacije izuzev u odnosu na vrednost određenu 180. dana laktacije. Vrednosti za koncentraciju fosfora u krvi utvrđene 150., 180., 210., 250. i 280 dana laktacije ($2,25 \pm 0,11$ mmol/L, $2,25 \pm 0,12$ mmol/L, $2,30 \pm 0,12$ mmol/L, $2,33 \pm 0,08$ mmol/L i $2,39 \pm 0,09$ mmol/L, pojedinačno) se nisu međusobno statistički značajno razlikovale.

5.2.11. Koncentracija magnezijuma

Koncentracija magnezijuma u krvi krava tokom ispitivanih perioda laktacije, kao i prosečna vrednost tokom laktacije prikazana je u Tabeli 42.

Tabela 42. Koncentracija magnezijuma (mmol/L) u krvi krava

| | X | SE | CV (%) | Min-Max |
|-------------------|------|------|--------|-----------|
| 10. dan | 1,08 | 0,06 | 22,83 | 0,62-1,67 |
| 30.dan | 1,18 | 0,00 | 28,69 | 0,67-1,94 |
| 60. dan | 1,21 | 0,06 | 18,91 | 0,89-1,58 |
| 90.dan | 1,28 | 0,08 | 23,95 | 0,53-1,52 |
| 150. dan | 1,32 | 0,08 | 24,18 | 0,77-1,69 |
| 180.dan | 1,37 | 0,07 | 19,63 | 0,95-1,69 |
| 210. dan | 1,36 | 0,08 | 21,74 | 0,98-1,80 |
| 250.dan | 1,36 | 0,06 | 16,66 | 0,85-1,60 |
| 280. dan | 1,35 | 0,06 | 16,91 | 0,96-1,75 |
| Laktacioni prosek | 1,28 | 0,03 | 9,99 | 1,08-1,45 |

Statistička značajnost razlika u koncentraciji magnezijuma u krvi krava između ispitivanih perioda laktacije uključujući i laktacioni prosek prikazana je u Tabeli 43.

Tabela 43. Statistička značajnost razlika (p vrednost) u koncentraciji magnezijuma između ispitivanih uzoraka krvi

| | 10.d | 30.d | 60.d | 90.d | 150.d | 180.d | 210.d | 250.d | 280.d |
|-------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| LP | 0,012 | 0,319 | 0,324 | 0,972 | 0,683 | 0,241 | 0,353 | 0,281 | 0,302 |
| 280.d | 0,005 | 0,128 | 0,107 | 0,497 | 0,735 | 0,818 | 0,939 | 0,975 | |
| 250.d | 0,005 | 0,121 | 0,099 | 0,479 | 0,715 | 0,839 | 0,960 | | |
| 210.d | 0,011 | 0,147 | 0,141 | 0,499 | 0,711 | 0,895 | | | |
| 180.d | 0,005 | 0,106 | 0,091 | 0,405 | 0,609 | | | | |
| 150.d | 0,036 | 0,284 | 0,311 | 0,772 | | | | | |
| 90.d | 0,065 | 0,414 | 0,479 | | | | | | |
| 60.d | 0,162 | 0,801 | | | | | | | |
| 30.d | 0,374 | | | | | | | | |

Legenda: LP-laktacioni prosek

Koncentracija magnezijuma utvrđena 10. dana laktacije bila je $1,08 \pm 0,06$ mmol/L, odnosno statistički značajno niža od vrednosti utvrđenih u periodu od 150. do 280. dana laktacije. Vrednosti za koncentraciju magnezijuma u krvi utvrđene 30., 60., 90., 150., 180., 210., 250. i 280. dana laktacije ($1,18 \pm 0,00$ mmol/L, $1,21 \pm 0,06$ mmol/L, $1,28 \pm 0,08$ mmol/L, $1,32 \pm 0,08$ mmol/L, $1,37 \pm 0,07$ mmol/L, $1,36 \pm 0,08$ mmol/L, $1,36 \pm 0,06$ mmol/L i $1,35 \pm 0,06$ mmol/L, pojedinačno) se nisu međusobno statistički značajno razlikovale.

5.3. Servis period ispitivanih krava

Servis period kod ispitivanih krava, odnosno period od teljenja do prvog uspešnog osemenjavanja, iznosio je $103,43 \pm 8,75$ dana (Min: 55,00 dana; Max: 154,00 dana; CV: 8,75).

6. DISKUSIJA

U ovoj disertaciji ispitivana je koncentracija hormona u mleku krava tokom celog laktacionog perioda sa ciljem da se utvrde variranja u koncentraciji hormona, za koje je od ranije poznato da zavise od faze laktacije (Malekinejad i Rezabakhsh, 2015). Dodatno je određena i koncentracija hormona u laktofrizu, kao i u komercijalnom mleku sa različitim procentom masti da bi se utvrdilo da li sadržaj masti ima uticaj na koncentraciju hormona u mleku. Dobijene vrednosti u laktofrizu i komercijalnom mleku su upoređene kako sa vrednostima koncentracija hormona kod svakog pojedinačnog merenja tako i sa laktacionim prosekom i vrednostima određenim u laktofrizu. U ovom poglavlju će se analizirati dobijeni rezultati i uporediti sa literaturnim vrednostima za svaki od ispitivanih hormona pojedinačno.

Pored koncentracija hormona, u ovoj disertaciji su prikazani rezultati za sastav mleka jer je dokazano da sastav mleka može značajno da utiče na zastupljenost hormona ali i da ukaže na energetski status ispitivane jedinke (Šamanc i sar., 2006). Dodatno, zastupljenost organskih sastojaka u mleku krava ukazuje i na rizik od pojave pojedinih bolesti kod ljudi (Cimmino i sar., 2023).

U disertaciji su određivani biohemijski parametri u krvi krava, a da bi se obezbedili podaci koji bi ukazivali na zdravstveni status ispitivanih jedinki. Naime, kako je iz literature poznato, biohemijski parametri krvi mogu da ukažu na eventualne uzroke metaboličkih poremećaja kod krava (Pupel i Kuczynska, 2016).

6.1. Promene u koncentracijama ispitivanih hormona u mleku krava u različitim periodima laktacije

U okviru ove disertacije ispitivane su koncentracije IGF-I, insulina, kortizola, tireoidnih hormona, progesterona i 17β -estradiola u mleku krava.

Koncentracija IGF-1 u mleku ispitivanih krava bila je najviša na početku laktacije ($9,23\pm 0,71$ ng/mL) a zatim je opadala kako je laktacija napredovala, što je u skladu sa literaturnim podacima. Naime, koncentracija IGF-1 je najveća u kolostrumu, odnosno prva 3 dana nakon teljenja, a zatim se njegova koncentracija u mleku značajno smanjuje (Collier i sar., 1991). Postoje navodi u literaturi da se koncentracije IGF-1 u kolostrumu iznosi i do 150 ng/mL, a da u mleku ta koncentracija opada do vrednosti od 1 do 5 ng/mL, koja se održava tokom čitave laktacije (Castigliero i sar., 2011). Zanimljivo je napomenuti da se u kolostrumu, izuzev IGF-1, nalazi i „skraćena“ varijanta ovog hormona, takozvani des (1-3)-IGF-1, kojoj na N terminalnom kraju nedostaju tri aminokiseline (Gly, Pro i Glu). Nedostatak ovih aminokiselina u molekulu des (1-3)-IGF-1 povlači sa sobom i smanjenje afiniteta prema IGFBP (*IGF binding proteins*), a samim tim i veću biološku aktivnost des (1-3)-IGF-1 u odnosu na IGF-1. Des (1-3)-IGF-1 je prisutan i u mleku, ali ima udeo od svega 3 % u ukupnoj količini IGF-1. U skladu sa navedenim koncentracijama IGF-1 iz literature i u našem radu se koncentracija IGF-1 značajno smanjivala sa napredovanjem laktacije pa je najniža koncentracija ovog hormona zabeležena 210. dana laktacije kada je iznosila $2,80\pm 0,22$ ng/mL. Dobijene vrednosti su u saglasnosti sa rezultatima JECFA (2014) gde je utvrđeno da je koncentracija IGF-1 u mleku od 0,3 do 15 ng/mL. Objašnjenje za visoku koncentraciju IGF-1 u mleku na početku laktacije leži u tome što se krave tada nalaze u stanju negativnog bilansa energije (Collier i sar., 2020). Kako mleko koje se dobija od krava na početku laktacije sadrži visoke nivoe IGF-1, ono može izazvati aktivan ćelijski rast, koji je nepoželjan kod onkoloških pacijenata. Stoga neki autoru ukazuju na moguću uzročnu posledičnu vezu između konzumaciju mleka krava i pojave kancera kod konzumenata (Harrison i sar., 2017). Suprotno tome, mleko u kasnim stadijumima laktacije je mnogo pogodnije za konzumaciju u svojoj prirodnoj formi a zbog smanjenog sadržaja IGF-1. Dodatno smo u ovoj disertaciji ispitivali koncentracije IGF-1

u komercijalnom mleku sa različitim sadržajem masti i utvrdili da komercijalno mleko sa 1,5% masti ima značajno nižu koncentraciju IGF-1 ($5,95 \pm 0,18$ ng/mL) u odnosu na komercijalno mleko sa 3,2% masti ($8,82 \pm 0,27$ ng/mL). Sve ove vrednosti su bile više u odnosu na one koje je objavio Vicini i saradnici (2008) koji je odredio koncentraciju IGF-1 od $5,95 \pm 0,18$ ng/mL u komercijalnom mleku. Marín-Quiroga i saradnici (2015) su utvrdili najviše koncentracije IGF-1 u punomasnom mleku, dok je niže vrednosti utvrdio u mleku sa nižim nivoom masti, sugerišući da masna frakcija mleka doprinosi ukupnom sadržaju IGF-1 u melku. S druge strane, tretman mleka toplotom, kao što je pasterizacija nema efekta na koncentraciju i distribuciju IGF-1, kao i insulina, u različitim frakcijama pasterizovanog i nepasterizovanog mleka (Ollikainen i Muuronen, 2013). Prihvaćeno je da konzumiranje mleka i mlečnih proizvoda sa visokim sadržajem IGF-1 može uzrokovati razvoj neoplastičnih procesa koji mogu povećati rizik od kancera kod ljudi (Qin i sar., 2009). Simonov i saradnici (2021) su ukazali da konzumacija mleka promovise proliferativne procese kod ljudi. Niži nivo ovih hormona u mleku je udružen sa nižim rizikom od kancera (Thornton i sar., 2016; Ventura i sar., 2019). Fraser i saradnici (2020) nisu utvrdili značajno povećani rizik od kancera dojke kod žena u Sjedinjenim Američkim Državama koje konzumiraju približno 160 mL komercijalnog mleka dnevno, bez obzira na sadržaj masti u mleku. Za završni zaključak koji se odnosi na uticaj koncentracije IGF-1 u mleka na zdravlje ljudi, neophodna su dalja istraživanja koja uključuju ne samo koncentraciju nego i količinu konzumiranog mleka unutar populacije ljudi.

Kada je u pitanju metodologija određivanja koncentracije IGF-1, pregledom literature se zapaža se da je koncentracija IGF-1 najčešće određivana RIA i sendvič ELISA metodom u uzorcima (obranog) mleka. Primena RIA metode zahteva pripremu uzorka, koja podrazumeva dodavanje alkoholnog (C_2H_5OH) rastvora mravlje ili hlorovodonične kiseline, čime se postiže obaranje pH uzorka mleka i odvajanje IGF-1 od IGFBP. Kasnijom neutralizacijom puferskim rastvorom sprečava se, u velikoj meri, ponovno vezivanje IGF-1 za IGFBP (Collier i sar., 1991). Međutim, postoji i druga mogućnost, a to je da se nakon snižavanja pH u uzorcima mleka ili obranog mleka, doda IGF-2 koji će, kada se doda u višku, vrlo efikasno sprečiti ponovno vezivanje IGF-1 za IGFBP. Ovo se smatra dosta povoljnom solucijom jer je unakrsna reaktivnost između IGF-1 i IGF-2 veoma mala, gotovo zanemarljiva (0,0016 %) (Daxenberger i sar., 1998). S druge strane, razvijeno je i nekoliko protokola za određivanje koncentracije IGF-1, u mleku krava, ELISA metodom. Ovi protokoli nalažu pripremu uzorka kravljeg mleka, koja se takođe zasniva na spuštanju pH (obranog) mleka i naknadnom dodavanju IGF-2 u višku (Castigliero i sar., 2011; Guidi i sar., 2007). Kako primena i RIA i ELISA metode zahteva prethodnu pripremu uzorka mleka na odgovarajući način, nijedna od ove dve metode s te strane nema prednost. Svakako je RIA metoda pogodna zbog osetljivosti, a nisku osetljivost obezbeđuju i sendvič ELISA kitovi. Granice osetljivosti koje su Guidi i sar. (2007) dobili primenom takvih kitova su bile 0,3 i 10 ng/mL mleka, sa *intraassay* CV od 6 % i *interassay* CV od 9,5 %, što se smatra prihvatljivim rezultatom u analitici.

U ovoj disertaciji je određivana i **koncentracija insulina u mleku** i prosečna koncentracija insulina u laktaciji je bila $17,59 \pm 0,56$ mIU/L, dok je koncentracija insulina u komercijalnom mleku sa 1,5 % mlečne masti bila $13,41 \pm 1,03$ mIU/L, a u komercijalnom mleku sa 3,2 % mlečne masti $18,77 \pm 0,90$ mIU/L. Ove vrednosti su u okviru onih koje je izvestio i Jouan i sar (2006), a koji je utvrdio da je koncentracija insulina bila 5-40 ng/mL. Inače, kao i u slučaju IGF-1, koncentracija insulina kao glavnog proteinskog anaboličkog hormona, je najviša u kolostrumu a zatim, tokom laktacije, postepeno opada. Tako, u istraživanju koje su sproveli Aranda i saradnici (1991) koncentracija insulina je u prvom kolostrumu bila 327 ng/mL. Nakon 24 časa, koncentracija insulina u kolostrumu je pala na 48 %, a nakon 72 časa na 26 % od početne vrednosti, da bi se 7. dana vrednosti stabilizovale na 46 ng/mL (14 % od početne vrednosti) (Aranda i sar., 1991). U našem ispitivanju je koncentracija insulina u mleku krava 10. dana laktacije bila $16,36 \pm 1,70$ mIU/L a najviše vrednosti je

dosegla 280. dana laktacije kada je iznosila $20,66 \pm 1,50$ mIU/L. Svakako da se nešto niže koncentracije insulina koje smo mi utvrdili u odnosu na vrednosti koje su dobili Aranda i saradnici (1991) mogu pripisati i metodologiji određivanja koncentraciji insulina. Problem za poređenje dobijenih vrednosti u odnosu na literaturne podatke je često u tome što se u dostupnoj literaturi nalazi malo podataka o koncentraciji insulina u mleku krava u različitim periodima laktacije a dodatno nije uvek jasno objašnjeno na koji način je uzorak mleka pripremljen za određivanje koncentracije insulina, bilo da je korišćena ELISA ili RIA metoda. Na primer, Zinicola i Bicalho (2019) navode da su, u cilju određivanja koncentracije insulina, uzorke mleka homogenizovali, a potom i centrifugirali ($10\ 000 \times g$), kako bi izdvojili supernatant i čuvali ga na $-20\ ^\circ\text{C}$ do analiza. Sa druge strane, Ontsouka i saradnici (2003) su koristili mlečni serum za određivanje koncentracije insulina RIA metodom, navodeći da su pratili smernice koje su dali Hadorn i saradnici (1997). Međutim, pregledom rada Hadorn i saradnika (1997), uočava se da oni nisu ni određivali koncentraciju insulina u kolostrumu ili mleku, a nisu ni opisali protokol za pripremu uzorka ili izvođenje RIA metode. Na kraju, treba se osvrnuti i na radove Ollikainen i Muuronen (2013) i Aranda i saradnika (1991), koji su koristili obrano mleko za određivanje koncentracije insulina ELISA metodom. Korišćenje obranog mleka u ove svrhe je i najlogičnije jer se insulin nalazi skoro podjednako zastupljen u serumskoj i kazeinskoj frakciji mleka. Uopšteno, ako se primenjuje ELISA metoda, treba uvek proveriti da li se granice osetljivosti dostupnog ELISA kita poklapaju sa očekivanim koncentracijama insulina u mleku i da li je isti validiran za uzorke mleka. Na kraju treba napomenuti da je koncentracija insulina u mleku i do stotinu puta više od onih u krvnoj plazmi (Jouan i sar., 2006) tako da se i time treba rukovoditi kod izbora metode za određivanje insulina u mleku krava. Mi smo se u našem radu opredelili za određivanje koncentracije insulina u mleku RIA metodom uz upotrebu komercijalnog kita. Kada je u pitanju potencijalni uticaj insulina prisutnog u mleku krava na zdravlje ljudi koji ga konzumiraju, treba napomenuti da su Paronen i saradnici (2000) utvrdili da je oralno izlaganje bovinom insulinu prisutnom u mleku krava izazvalo insulin-specifični odgovor T ćelija i antitela kod novorođene dece i dovelo do povećanog rizika od tipa 1 dijabetesa. Za novorođenčad koja su kasnije razvila tip 1 dijabetes ili autoimunitet na beta ćelije pankreasa je utvrđeno da su imala narušenu oralnu toleranciju, ne samo na insulin unet oralnim putem nego i na proteine krava uopšteno (Luopajarvi i sar., 2008). Peptidi insulina u mlečnim formulama na bazi surutke mogu potencijalno da izazovu štetan odgovor T ćelija (Tollefsen i ar., 2006). U skladu sa tim, bovini peptidi insulina u surutki mleka mogu delovati kao imitatori sredine autoantigenih peptida i indukovati netolerantne T ćelije da aktiviraju autoreaktivnost protiv primarnog autoantigena odnosno humanog insulina prisutnog u ćelijama Langerhansovih ostrvaca (Vaarala i sar., 2012). Nema podataka u literaturi o nivoima insulina koji predstavljaju rizik za zdravlje ljudi, ali pomenuti autori navode da unos mleka krava može uzrokovati tip 1 dijabetesa kod dece. Ipak, ovakve tvrdnje treba preispitati dodatnim istraživanjima.

U okviru ispitivanja hormona mleka ispitivali smo i **koncentracije slobodnog tiroksina i trijodtironina**. Dobijeni rezultati su pokazali da je koncentracija slobodnog tiroksina varirala između $0,198 \pm 0,009$ ng/dL i $0,239 \pm 0,007$ ng/dL. Ove vrednosti su niže od onih koje su utvrdili Pezzi i saradnici (2003) koji su ustanovili vrlo niske vrednosti za slobodan tiroksin u kolostrumu ($0,70 \pm 0,1$ ng/mL), sa dodatno opadajućim vrednostima u narednim uzorcima kolostruma koje su bile ispod nivoa detekcije. Kada je u pitanju koncentracija slobodnog trijodtironina, koncentracija ovog hormona je varirala između $3,14 \pm 0,22$ i $6,61 \pm 0,44$ ng/dL. Naši rezultati za slobodan trijodtironin u ranoj laktaciji su bili u skladu sa rezultatima koje su objavili Pezzi i saradnici (2003), pošto su oni izvestili da je koncentracija slobodnog trijodtironina u mleku opadala kako je rana laktacija napredovala jer su najviše vrednosti utvrđene u kolostrumu 0. dana laktacije ($3,54 \pm 0,81$ ng/dL) i te vrednosti su bile značajno smanjenje 5. dana laktacije i stabilno se smanjivale tokom dva meseca. Pan'kiv i Simonov (2020) su utvrdili da su koncentracije slobodnog tiroksina i trijodtironina bile $4,92$ i $4,75$ nmol/L tri

dana nakon teljenja, a da su smanjene do vrednosti od 2,15 i 2,35 nmol/L dve nedelje posle teljenja kada su iznosile 1,77 i 1,56 nmol/L između 30. i 40. dana. Prema Pan'kiv i Simonov (2020) koncentracije trijodtironina i tiroksina u kolostrumu su najviše i to se može objasniti potrebom da se stimuliše metabolički proces kod novorođenih teladi, pošto njihov endokrini system još nije sazreo. Pad koncentracije tiroidnih hormona u mleku krava u kasnijim stadijumima laktacije može biti vezan sa promenama u metabolizmu kod krava koje smanjuju potrebu za egzogenim hormonima kod teladi (Pan'kiv i Simonov, 2020). Pezzi i saradnici (2003) su potvrdili da su mlečne krave u stanju hipotireoze tokom rane laktacije, ali ostaje otvoreno pitanje da li je to stanje hipotireoze kod krava u laktaciji uzrok posledične smanjene aktivnosti dejodinaza u jetri. Jedno od mogućih objašnjenja za hipotiroidizam kod mlečnih krava je sekrecija tiroidnih hormona u mleko u niskim koncentracijama. U našoj studiji, koncentracija tiroidnih hormona u komercijalnom mleku sa 1,5% mlečne masti je bila $0,139 \pm 0,006$ ng/dL i $3,79 \pm 0,24$ ng/dL za slobodni tiroksin i trijodtironin, pojedinačno, i $0,191 \pm 0,003$ ng/dL i $6,09 \pm 0,23$ ng/dL, pojedinačno, za mleko sa 3,5% mlečne masti. Nema podataka u literaturi koji se odnose na slobodni tiroksin i slobodni trijodtironin u komercijalnom mleku i nivo koji predstavlja rizik za zdravlje ljudi tako da ovo polje zahteva dodatna ispitivanja. Kada je u pitanju metodologija određivanja koncentracija tiroidnih hormona u mleku treba napomenuti da određivanje koncentracije tiroidnih hormona zahteva prethodnu ekstrakciju istih iz uzoraka punog mleka. Postoji nekoliko protokola koji se koriste za njihovu ekstrakciju, ali se u literaturi najčešće navodi onaj koji su opisali Slobodziński i saradnici (1986). Literaturni podaci ukazuju da je RIA metoda najčešće korišćena za određivanje koncentracije tiroidnih hormona u mleku krava (Akasha i Anderson, 1984; Kahl i sar. 1995; Nizantkowska-Blaž i sar., 1998; Pezzi i sar., 2003; Slobodziński i sar., 2008). Iako je izvođenju RIA metode, u gotovo svim studijama, prethodio postupak ekstrakcije tiroidnih hormona, Pezzi i saradnici (2003) su primenjivali ovu metodu bez prethodne ekstrakcije hormona iz uzorka mleka. Osim toga, oni su jedini prikazali koncentracije ukupnog i slobodnog T3 i T4. mi smo se u našem radu opredelili za određivanje koncentracije ovih hormona ELISA metodom.

Koncentracija kortizola određena u mleku ispitivanih krava se kretala u rasponu od $0,259 \pm 0,014$ ng/dL koliko je iznosila 60. dana i $0,342 \pm 0,008$ ng/dL koliko je iznosila 250. dana laktacije. Gellrich i saradnici (2015) su utvrdili najvišu koncentraciju u mleku tokom prve nedelje laktacije ($5,8 \pm 0,48$ nmol/L) dok su kasnije vrednosti određivane svake nedelje bile između 3,6 i 6,2 nmol/L. Koncentracija kortizola u mleku je niža nego u krvi, varirajući između 500 pg/mL i 10 ng/mL (Fukasawa i sar., 2008). Postoje podaci da koncentracija glukokortikosteroida u mleku predstavlja samo 4 % njihove koncentracije u krvnoj plazmi, što navodi na zaključak da glukokortikosteroidi u manjoj meri prelaze u mleko. Pri tome, dominantni glukokortikosteroid u krvnoj plazmi je kortizol (66 %), dok je u mleku to kortikosteron (90 %)(Jouan i sar., 2006). Treba dodati da, kada je u pitanju kortizol prisutan u mleku, on nalazi u gotovo jednakim (približnim) koncentracijama u punomasnom i obranom mleku. Zanimljiv je i podatak da kortizol ima jednaku distribuciju između kazeinske i serumske frakcije kravljeg mleka (Jouan i sar., 2006; Schwalm i sar., 1978). Koncentracija glukokortikosteroida u mleku postepeno opada tokom laktacije, što je utvrđeno i u našem radu jer je vrednost 7. dana laktacije bila $0,336 \pm 0,015$ ng/dL, a 280. dana je iznosila $0,259 \pm 0,014$ ng/dL. Prema literaturnim podacima koncentracija glukokortikosteroida u mleku iznosi $0,59 \pm 0,11$ ng/mL u prva dva meseca, $0,28 \pm 0,04$ ng/mL između 5. i 7. meseca i $0,25 \pm 0,02$ ng/mL između 9. i 11. meseca laktacije. Opisani pad koncentracije glukokortikosteroida u mleku je posledica značajnijeg pada koncentracije kortizola, dok koncentracija kortikosterona blago raste u istim periodima laktacije (Jouan i sar., 2006). U našoj studiji je koncentracija kortizola u komercijalnom mleku sa 1,5% mlečne masti bila $0,229 \pm 0,011$ ng/dL a u komercijalnom mleku sa 3,5% mlečne masti je bila $0,342 \pm 0,016$ ng/dL. Malekinejad i Razabakhsh (2015) su utvrdili da je koncentracija kortizola još uvek detektibilna u komercijalnim mlečnim proizvodima nakon procesa pasterizacije i sterilizacije, i njena koncentracija i struktura nije značajno

narušena posle tretmana visokom temperaturom. Xu i saradnici (2009) nisu našli značajnu razliku u sadržaju kortizola između bovinog i humanog kolostruma. Na osnovu naših rezultata i rezultata drugih autora, može se pretpostaviti da kortizol prisutan u mleku krava nema nepovoljan efekat na decu, s obzirom da prisustvo rezidua kortizola u komercijalnim mlečnim proizvodima ne predstavlja problem za zdravlje potrošača, pošto su nivoi obično vrlo mali i bezopasni (Qu i sar., 2018). Dalje studije su potrebne da bi se ispitaio rizik i sporedni efekti većeg nivoa konzumiranja mleka krava od strane drugih kategorija potrošača, iako su oni izloženi veoma niskim nivoima rezidua kortizola u mleku. Na kraju je potrebno napomenuti da je na dan uzimanja uzoraka mleka za određivanje koncentracije kortizola, ogleadne krave trebalo neophodno poštediti bilo kakvih tretmana ili procedura, odnosno, uticaja koji mogu prouzrokovati stres, što je u ispoštovao u ogledu koji je izveden u okviru ove disertacije.

Koncentracija progesterona (P_4) je 2 do 4 puta viša u mleku nego u krvnoj plazmi krava (Jouan i sar., 2006; Ginther i sar., 1974). Takođe, progesteron (P_4) se skoro u potpunosti nalazi u frakciji mleka bogatoj mlečnom masti (Schwalm i sar., 1978). Na osnovu toga, za određivanje koncentracije progesterona u mleku neophodno je koristiti uzorak punomasnog mleka. Za razliku od estrogena, čije prisustvo u hrani životinjskog porekla ima veliki javno-zdravstveni značaj, prisustvo progesterona u mleku nema toliko izražen zdravstveni značaj, već pažnju, uglavnom stručne javnosti i proizvođača, zaokuplja zbog svog značaja u proceni reproduktivnog statusa krava. Ova činjenica je, verovatno, doprinela tome da se najveći broj istraživanja fokusira na ispitivanje koncentracije P_4 u mleku tokom polnog (estralnog) ciklusa i perioda do prvog osemenjavanja nakon teljenja, a sve u cilju opisivanja „normalnog“ i „patološkog“ obrasca P_4 . Zbog toga su razvijeni brojni sistemi i modeli za praćenje koncentracije P_4 u mleku, koji se primenjuju na farmama i omogućavaju povećanje reproduktivne efikasnosti i profitabilnosti proizvodnje. Prema tome, porast koncentracije progesterona u mleku se često kod krava koristi u dijagnostici gravoiditeta (Hoffmann i sar., 1977). Za određivanje koncentracije progesterona u biološkim materijalima uključujući i mleko najčešće se koristi ELISA metoda. Ova metoda je dosta pogodna, jer ne uključuje komplikovanu pripremu uzorka, a koristi se punomasno mleko. Za razliku od ove metode, primena RIA metode u merenju koncentracije P_4 zahteva pripremu uzorka, odnosno, ekstrakciju i izolaciju P_4 iz uzorka mleka (Ginther i sar., 1974). Postavlja se samo pitanje da li je ELISA metoda primenljiva u svim periodima laktacije, s obzirom da je koncentracija P_4 u mleku, u prve tri nedelje laktacije, izrazito niska, odnosno često ispod nivoa osetljivosti za većinu dostupnih ELISA kitova. Granice osetljivosti za većinu komercijalnih ELISA kitova se kreću od 1,0 ili 2,0 do 20,0 ili 30,0 ng/mL mleka.

U našem ogledu koncentracija progesterona je bila viša u komercijalnom mleku sa višim sadržajem masti u odnosu na mleko sa nižim sadržajem masti što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora (Vicini i sar., 2008). Iz literature je poznato da se progesteron raspoređuje pretežno unutar masne frakcije mleka. (Gunzler i sar., 1975). Vrednosti koje smo dobili u našem radu za koncentraciju progesterona tokom laktacije su, takođe, u skladu sa rezultatima Rioux i Rajotte (2004), dok su rezultati za koncentraciju progesterona u komercijalnom mleku u saglasnosti sa rezultatima Hoffmann i saradnika (1975). Koncentracija progesterona koju smo odredili u komercijalnom mleku je niža nego što je endogena produkcija ovog hormona u organizmu ljudi (Pape-Zambito i sar., 2007).

Kada je u **pitanju koncentracija estrogena**, u mleku su najčešće određivane koncentracije E_1 i βE_2 . Mi smo u našem radu određivali koncentraciju βE_2 . U literaturi je utvrđeno da su koncentracije estrogena u mleku krava veće od onih u krvi, kao i da postoji korelacija između koncentracije estrogena u mleku i krvi. U skladu sa tim, ukoliko su nam za odgovarajuće faze proizvodnog ciklusa odnosno laktacije poznate koncentracije estrogena u krvi, moglo bi se pretpostaviti kolike će koncentracije estrogena biti prisutne u mleku. Literaturni podaci ukazuju da (egzogeni) estrogeni mogu doprineti razvoju malignih tumora dojke, materice i jajnika kod žena, dok se kod muškaraca najčešće navode maligni tumori testisa i prostate, odnosno, onih tkiva koja su osetljiva na estrogene. U tom pogledu,

najpotentniji je βE_2 , ali je njegova koncentracija u krvi i mleku niža od koncentracije E_1 . Međutim, poznato je da, katalitičkom aktivnošću specifičnih enzima (*17- β hidroksterooid dehidrogenaza*), od E_1 može nastati βE_2 . Zbog toga mnogi autori preporučuju da se odrede koncentracije obe vrste estrogena u mleku krava. Procenjeno je da egzogeni estrogeni, poreklom iz mleka, mesa ili biljne hrane, ne izazivaju fiziološke efekte kod ljudi ukoliko njihov dnevni unos ne prelazi 1 % količine endogeno proizvedenih estrogena u delu populacije ljudi sa najnižom dnevnom produkcijom estrogena (US DHHS-FDA, 2016). Ovom delu populacije pripadaju devojčice i dečaci u prepubertalnoj životnoj dobi, koji imaju dnevnu proizvodnju estrogena od približno 54 000 ng. Koncentracija estrogena koju smo u našem ogledu odredili u komercijalnom mleku je niža nego što je endogena produkcija ovog hormona u organizmu ljudi (Pape-Zambito i sar., 2007). Pregledom literature zapaža se da je koncentracija estrogena najčešće određivana RIA metodom, korišćenjem protokola koje su opisali Monk i saradnici (1975) i Wolford i Argoudelis (1979), ili njihovom modifikacijom. Pomenuti protokoli opisuju postupak ekstrakcije i izolacije E_1 i βE_2 estrogena koji je, sudeći po opremi i hemikalijama koje se koriste, prilično složen i zahteva mnogo vremena. Takođe, noviji radovi su ispitali primenu tačne hromatografije sa masenom spektrometrijom, iz čega proizilazi zaključak da se i ova metoda može koristiti za određivanje koncentracije estrogena u mleku krava. Međutim, primena ove metode je takođe prilično zahtevna i skupa. Koncentraciju E_1 i βE_2 je najbolje određivati ELISA metodom jer upotreba ELISA kitova ne zahteva komplikovanu pripremu uzoraka mleka pošto se koristi punomasno mleko. Grgurevic i saradnici (2016) su izvršili parcijalnu validaciju ove metode, koju su kasnije koristili i Snaj i Majdić (2018). Prema podacima iz ova dva rada, granice osetljivosti su 1,5 i 200 pg/mL mleka za βE_2 (Estradiol-sensitive ELISA kit). Koncentracija estrogena se ne može određivati u mlečnom serumu jer se estrogen, skoro u potpunosti, nalazi u frakciji mleka bogatoj mlečnom masti (Schwalm i sar., 1978). Zbog toga je ELISA metoda naročito pogodna jer se kao uzorak koristi punomasno mleko. Bitno je napomenuti da se estrogeni, u procesu ekstrakcije i izolacije, gube u određenoj meri iz uzorka mleka. U našem radu, očekivano, koncentracija estrogena je bila u viša u komercijalnom mleku sa višim sadržajem masti, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora (Vicini i sar., 2008).

6.2. Promene u koncentracijama ispitivanih organskih sastojaka mleka

Ispitivanje organskih sastojaka mleka kod krava vrši se u okviru redovnih analiza na farmama krava a u cilju ispitivanja kvaliteta proizvoda namenjenog za ishranu ljudi. Dodatno, rezultati koji se dobiju mogu biti značajni dijagnostički parametar za otkrivanje grešaka u ishrani, odnosno uzroka pojave pojedinih bolesti kod krava. Mi smo se u našem radu opredelili za ispitivanje sadržaja masti i proteina u pojedinačnim uzorcima mleka ispitivanih krava kao i u laktofrizu i komercijalnom mleku sa različitim procentom masti. Naime, utvrđeno je da procenat masti u mleku može značajno da utiče na prisustvo hormona.

Masti mleka se stvaraju u mlečnoj žlezdi i to pre svega iz acetata, ali jednim delom i od buterne kiseline, dok propionska kiselina nema neposrednu ulogu u nastanku masti mleka. Pošto je za obroke koji sadrže puno strukturnih ugljenih hidrata (celuloza, hemiceluloza), značajan veći udeo sirćetne kiseline, onda će krave hranjene takvim obrokom imati veći sadržaj masti u mleku nego ukoliko se pretežno hrane koncentratima, koji dovode do stvaranja veće količine propionske kiseline. Značajan izvor masti mleka su i masti koje potiču iz telesnih depoa. Mleko prosečno sadrži 3,5 % masti. Kako je napomenuto, sadržaj masti u mleku je prevashodno povezan sa ishranom krava, mada na sadržaj masti u mleku utiču i genetski faktori, stadijum laktacije, starost krava, zdravstveno stanje vimena i temperatura sredine. Vrednosti, koje su kod pojedinih krava niže od 3,8 % (bez obzira na sve druge uticaje, koji pored ishrane utiču na sadržaj masti u mleku) su pokazatelji, da je u obroku premalo

strukturnih sirovih vlakana. Ako je u mleku krava prilikom prve mlečne kontrole nakon teljenja više od 5,0 % masti, to je pouzdan pokazatelj povećanog korišćenja sopstvenih telesnih rezervi. Kod tih krava možemo da sumnjamo na postojanje sindroma debelih krava i da očekujemo postojanje subkliničke ketoze. Idući ka kraju laktacije, dešava se da je kod krava sa smanjenom mlečnošću sadržaj masti u mleku povećan ali to ne ukazuje ni na kakvu opasnost od razvoja metaboličkih bolesti. Proteini mleka su proizvod mlečne žlezde. Nastaju delom iz proizvoda nastalih razlaganjem proteina od strane mikroorganizama buraga, a delom iz albumina, globulina, fibrinogena i neproteinskog azota krvne plazme. Količina belančevina u mleku varira od 3,30 do 3,95 %. Ciljne vrednosti, koje kod krava savremenih rasa postavljamo su 3,4 % belančevina u mleku. U sklopu proteina mleka ulazi više frakcija belančevina koje se razlikuju po molekularnoj težini, strukturi i fiziološkim svojstvima. Osnovne frakcije su kazein, albumini i globulini. S obzirom na poreklo delimo ih na belančevine iz mlečne žlezde i belančevine iz krvi. U prvu grupu spadaju kazein, laktoalbumini i laktoglobulini, a u drugu grupu serumski albumini i imunoglobulini. Enzimi koji se nalaze u mleku pripadaju takođe proteinima. Na sadržaj belančevina u mleku utiču genetski faktori, stadijum laktacije, starost krava, zdravstveno stanje vimena i temperatura sredine. Uticaj ishrane na sadržaj belančevina u mleku je znatno kompleksniji nego na sadržaj masti. Vrednosti ispod 3,20 %, a pogotovo vrednosti ispod 3,10 % su pokazatelji grešaka u ishrani. Smanjenje sadržaja belančevina u mleku izazivaju i metaboličke bolesti kao što su ketoza i hipokalcemija. Supklinički i klinički mastitisi smanjuju sadržaj belančevina u mleku radi povećane fermentacije već sintetisanih proteina mleka, prevashodno kazeina, unutar mlečne žlezde.

Rezultati koje smo utvrdili u mleku krava za koncentraciju masti i proteina su u saglasnosti sa radovima drugih autora i nalaze se u okviru referentnih vrednosti za ovu kategoriju životinja (Vicini i sar., 2008)

6.3. Promene u koncentracijama insulina i različitih biohemijskih parametara u krvi ispitivanih krava

Biohemijski parametri krvi, zajedno sa insulinom, kao najznačajnijim hormonom povezanim sa energetske metabolizmom kod krava, ispitivani su u cilju procene metaboličkog statusa. Metabolički profil, koji obuhvata ispitivanje biohemijskih parametara krvi, se često koristi kod krava da bi se procenilo zdravlje ali i prevenirala pojava bolesti (Pupell i Kuczynska, 2016). Dobijaju se podaci o bilansu organskih i neorganskih materija, kao i funkcionalnom stanju pojedinih organa značajnih u metabolizmu (jetra). Određivanje metaboličkog profila ima poseban značaj na farmama visokomlečnih rasa goveda, kod kojih je, u cilju postizanja što veće proizvodnje mleka, metabolizam opterećen do krajnjih fizioloških granica. Tada veoma lako dolazi do disbalansa između unosa hranljivih materija i potreba organizma koji često dovodi do poremećaja homeostaze i nastajanja metaboličkih bolesti u kliničkoj i supkliničkoj formi. Posebna vrednost metaboličkog profila je upravo u tome što se mogu utvrditi promene u sastavu krvi pre no što se ispolje klinički znaci bolesti i dođe do smanjenja proizvodnje. Zbog toga ovaj dijagnostički test, ima najveći značaj u preveniranju metaboličkih oboljenja. U našem radu smo, pored koncentracije insulina, određivali koncentraciju glukoze, ukupnih proteina, albumina, uree, ukupnog bilirubina, aktivnosti ALTa i ASTa, koncentracije kalcijuma, fosfora i magnezijuma.

Koncentracija insulina se u našem radu povećavala sa napredovanjem laktacije tako da je 10. dana bila $17,41 \pm 0,99 \mu\text{U/mL}$ dok je 280. dana bila $27,67 \pm 1,98 \mu\text{U/mL}$. Niska koncentracija insulina na početku je posledica negativnog bilansa energije na početku laktacije (Mekuriaw, 2023). Naime, na početku laktacije je značajno da je koncentracija insulina niska jer je to glavni anabolički hormon.

Njegovom niskom koncentracijom favorizuju se katabolički procesi. Dodatno, time se smanjuje ulaz glukoze u periferna tkiva preko insulin zavisnih receptora za glukozu (GLUT 4) pa se glukoza preusmerava ka onim tkivima gde je ulaz glukoze nezavisan od insulina a to je pre svega mlečna žlezda (Youssef i El-Ashjer, 2017). Rezultati koje smo dobili u našem radu a vezano za koncentraciju insulina u krvi krava su u skladu sa rezultatima Schwalm i Schultz (1975). Kada se uspostavi energetska ravnoteža na sredini laktacije, koncentracija insulina raste i tako počinje njegoa anabolička uloga. On se vezuje za insulin zavisne receptore za glukozu u perifernim tkivima (GLUT 4) i na taj način preusmerava glukozu ka mišićnom i masnom tkivu.

Koncentracija glukoze se u našem radu povećavala sa napredovanjem laktacije tako da je 10. dana bila $3,12 \pm 0,20$ mmol/L a 30. dana $2,85 \pm 0,22$ mmol/L dok je 280. dana bila $3,94 \pm 0,009$ mmol/L. Koncentracija glukoze na početku laktacije je niža i u skladu sa rezultatima drugih autora (Šamanc i sar. 2009b; Schwalm i Schultz, 1975) a posledica je toga što se krave tada nalaze u stanju negativnog bilansa energije (Mekuriaw, 2023). Kasnije tokom laktacije, u skladu sa promenom metaboličkog statusa koncentracija glukoze raste. Naši rezultati za koncentraciju glukoze u krvi krava u kasnijim stadijumoma laktacije su u skladu sa rezultatima drugih autora (Prodanović i sar., 2010). Treba naglasiti da je glukoza pouzdan pokazatelj energetskog statusa kod svih vrsta životinja. Za razliku od nepreživara kod kojih glukoza krvi najvećim delom potiče od glukoze resorbovane iz digestivnog trakta, kod preživara glukoza krvi većim delom nastaje u procesu glukoneogeneze u jetri. Zbog toga, poremećaj glikemije kod preživara ukazuje, ne samo na poremećaj u unosu energije putem obroka, već često i na poremećaj u funkciji jetre. Pri tumačenju rezultata glikemije treba imati u vidu da su homeostatski mehanizmi koji održavaju normoglikemiju veoma razvijeni, tako da do poremećaja u njenoj koncentraciji dolazi tek onda kada se iscrpe svi kompenzatorni mehanizmi u organizmu. Koncentracija glukoze u krvi preživara je fiziološki u opsegu od 2,22 do 3,33 mmol/L. Niže vrednosti ukazuju na stanje hipoglikemije a više na stanje hiperglikemije.

Koncentracija ukupnih proteina se u našem radu povećavala sa napredovanjem laktacije. Vrednosti koje smo dobili za koncentraciju proteina na početku laktacije su u skladu sa radovima drugih autora koji su utvrdili da je koncentracija proteina u krvnoj plazmi goveda u rasponu od 68 do 84 g/l (Šamanc i sar. 2009b).

Koncentracija albumina se u našem radu povećavala sa napredovanjem laktacije. Vrednosti koje smo dobili u našem radu za koncentraciju albumina su u skladu sa radovima drugih autora koji su utvrdili da je koncentracija albumina u krvnoj plazmi goveda u rasponu od 24 do 40 g/l (Šamanc i sar. 2009b). Inače, poznato je da se albumini sintetišu u jetri, tako da se hipoalbuminemija često javlja kod oštećenja funkcije jetre ili deficita proteina u ishrani. Smanjenje koncentracije albumina u metaboličkom profilu treba uvek posmatrati zajedno sa koncentracijom uree. Ako je pri hipoalbuminemiji koncentracija uree normalna, ili povišena, onda je verovatno u pitanju oboljenje jetre, dok ukoliko je hipoalbuminemija udružena sa niskom koncentracijom uree u krvi, onda je u pitanju deficit proteina u ishrani. Koncentracija albumina se, u odnosu na koncentraciju uree, menja relativno sporo zbog sporije sinteze i razgradnje. Za značajnije promene u koncentraciji albumina potreban je najmanje jedan mesec. Zato se smatra da koncentracija uree daje sliku promene zastupljenosti proteina u hrani vrlo brzo nakon što do nje dođe, dok koncentracija albumina ukazuje na dugotrajni disbalans u metabolizmu proteina.

Koncentracija uree se u našem radu povećavala sa napredovanjem laktacije. Vrednosti koje smo dobili za koncentraciju uree tokom laktacije su u skladu sa radovima drugih autora gde je utvrđena prosečna koncentracija uree u rasponu od 3,33 do 4,99 mmol/l. (Prodanović i sar., 2010). Naime,

poznato je da mikroflora predželudca koristi belančevine unete hranom, razlaže ih do amonijaka, a zatim koristi za sintezu sopstvenih proteina. Višak amonijaka, neiskorišćenog od bakterija buraga, se resorbuje, odlazi u jetru i koristi za sintezu uree. Prema tome, koncentracija uree u krvi preživara je prevashodno posledica njihove snabdevenosti azotnim jedinjenjima iz hrane. Višak proteina u obroku dovodi do povećanja, a manjak do smanjenja koncentracije uree u krvi. S druge strane, za pravilno funkcionisanje bakterija buraga potrebno je prisustvo energije, zbog čega nedovoljan sadržaj energije u obroku uslovljava smanjenu aktivnost mikroflora buraga, tako da ona ne može u celosti da iskoristi amonijak za sintezu sopstvenih proteina. Višak amonijaka se tada resorbuje i dospeva u jetru gde se stvara povećana količina uree. Zbog toga je deficit ugljenih hidrata u ishrani redovno praćen povećanjem koncentracije uree u krvi. Vreme hranjenja utiče na koncentraciju uree u krvi, zbog čega uzorke za metabolički profil treba uzimati tačno određeno vreme nakon hranjenja (preporučuje se 4 do 6 sati posle obroka).

Koncentracija ukupnog bilirubina se u našem radu smanjivala sa napredovanjem laktacije. Vrednosti koje smo dobili za koncentraciju proteina na početku i tokom laktacije su u skladu sa radovima drugih autora (Šamanc i sar. 2009b; Prodanović i sar., 2010). Koncentracija ukupnog bilirubana je pokazatelj funkcionalnog stanja jetre kod krava u laktaciji (Prodanović i sar., 2010), tako da je ona najviša na početku laktacije kada je jetra, zbog rastuće proizvodnje mleka, najviše metabolički opterećena.

Aktivnosti ALTa i ASTa su takođe značajni indikatori zdravlja jetre kod krava (Bobe i sar., 2004). Njihova vrednost se u našem radu smanjivala sa napredovanjem laktacije. Vrednosti koje smo dobili za aktivnost ovih enzima je bila u skladu sa rezultatima drugih autora (Andjelić i sar., 2022)

Koncentracije kalcijuma, fosfora i magnezijuma su pokazatelji mineralnog statusa krava u laktaciji i njihov poremećaj na početku laktacije može dovesti do „sindroma ležeće krave“ (Goff, 2004). Vrednosti koje smo dobili za koncentraciju kalcijuma i fosfora su u skladu sa rezultatom koji su dobili Adamović i saradnici (2014) a gde je utvrđena koncentracija kalcijuma od 2,43 do 3,10 mmol/L a fosfora 1,6 do 2,2 mmol/L. Koncentracija magnezijuma koju smo dobili u ovom radu je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora a gde je utvrđena koncentracija magnezijuma od 0,8 do 1,3 mmol/L (Lobo i sar., 2023). Inače, kalcijum i neorganski fosfor imaju važnu ulogu u rastu telesnih tkiva, prevashodno kostiju i proizvodnji mleka. Neorganski fosfor, dodatno, ima značajnu ulogu u procesu varenja kod preživara jer se u velikoj količini sekretuje iz krvi u pljuvačku a zatim utiče na aktivnost flore i faune buraga. U toku graviditeta, kalcijum i fosfor su značajni za rast fetusa, dok tokom laktacije utiču na sintezu mleka. Sve više se ističe uloga fosfora u pravilnoj funkciji reproduktivnih organa krava. Koncentracija kalcijuma u krvi je kontrolisana jakim homeostatskih mehanizama. Neorganski fosfor, međutim, nije pod tako jakom kontrolom, zbog čega je njegova koncentracija u krvi podložna većim variranjima. Ovakva raspodela kontrolnih mehanizama u organizmu je fiziološki opravdana jer smanjenje koncentracije kalcijuma dovodi do ozbiljnih oštećenja funkcija organizma (tetanija, pareze i paralize, koma i na kraju uginuće životinje), dok smanjenje koncentracije neorganskog fosfora ne dovodi do trenutnih i jakih oštećenja organizma, iako dugoročno ipak dovodi do atipične puerperalne pareze, smanjene mineralizacije kostiju i osteoporoze. Magnezijum je izuzetno značajan za održavanje zdravlja krava. Hipomagnezijemija je čest metabolički problem kod krava. Razlog tome je način ishrane preživara. Naime, biljke na paši za svoj rast zahtevaju malu količinu magnezijuma, ali puno kalijuma. Zbog toga se za njihov rast koriste kalijumova đubriva koja dovode do viška kalijuma u biljnoj masi, koja, kada dospe u digestivni trakt preživara inhibira resorpciju magnezijuma dovodeći do hipomagnezijemije sa posledičnom kliničkom slikom pašne tetanija. Hipomagnezijemija se ne javlja,

međutim, samo u proleće kada životinje izlaze na pašu, već i u ostalim delovima godine ako se u ishrani krava koriste seno i silaža sa polja koja su deficitarna u magnezijumu a suficitarna u kalijumu.

S obzirom da je ispitivanje insulina i pojedinih biohemijskih parametara u krvi ispitivanih krava vršeno da bi se procenilo zdravlje životinja, treba napomenuti da su koncentracije svih biohemijskih parametara kao i koncentracija insulina koja je izmerena u krvi krava u našem ogledu bili u okviru referentnih vrednosti koje su utvrdili Cozzi i saradnici (2011) i Moretti i saradnici (2017) što ukazuje na to da su životinje uključene u ovu studiju bile zdrave.

7. ZAKLJUČCI

1. Ispitivani hormoni (IGF-1, inuslin, kortizol, fT₃, fT₄, iE₂ i P₄) su bili zastupljeni u mleku krava u koncentracijama koje su više od praga osetljivosti preporučenih metoda za određivanje koncentracija hormona u mleku a njihova koncentracija je značajno varirala zavisno od faze laktacije.
2. Ispitivani hormoni (IGF-1, inuslin, kortizol, fT₃, fT₄, iE₂ i P₄) su imali značajno niže koncentracije u komercijalnom mleku sa 1,5% masti nego u komercijalnom mleku sa 3,2 % masti, mleku iz laktofriza i laktacionim prosekom za ispitivani hormon. Izuzetak je laktacioni prosek za IGF-1, koji je bio značajno miži nego nivo IGF-1 u komercijalnom mleku sa 1,5% masti, kao i laktacioni prosek za 17β-estradiol koji se nije značajno razlikovao u odnosu na nivo estrogena u komercijalnom mleku sa 1,5% masti.
3. Uzimajući u obzir značajno višu koncentraciju ispitivanih hormona (IGF-1, inuslin, kortizol, fT₃, fT₄, iE₂ i P₄) u komercijalnom mleku sa 3,2 % masti u odnosu na komercijalnom mleku sa nižim procentom masti (1,5%), može se pretpostaviti da mleko sa višim procentom masti pored benifita koje ima u ishrani ljudi, a koje je posledica njegove nutritivne vrednosti, potencijalno može da izazove negativni uticaj na zdravstveni status konzumenata, ukoliko se unosi u značajno višim količinama u odnosu na preporučene količine za određenu kategoriju konzumenata.
4. Dobijeni rezultati daju doprinos istraživanjima koji će omogućiti da se utvrde kritične odnosno prazne vrednosti koncentracije hormona u mleku koje mogu da imaju potencijalno negativni uticaj na zdravlje ljudi kao i preporučene dnevne količine unosa mleka posebno za određene socijalne grupe sa povećanim rizikom ili genetskom predispozicijom za razvoj pojedinih kancera ili endokrinoloških problema.
5. Koncentracije masti, proteina i laktoze u mleku ispitivanih krava su bile u okviru referentnih vrednosti ukazujući na zadovoljavajuću nutritivnu vrednost ispitivanog mleka.
6. Koncentracija insulina i biohemijskih parametara (glukoze, albumina, ukupnih proteina, ukupnog bilirubina, uree, aspartat aminotransferaze, alanin transaminaze, kalcijuma, fosfora i magnezijuma) u krvi ispitivanih krava bila je u okviru referentnih vrednost tokom laticionog perioda, odnosno perioda kada je vršeno ispitivanje, ukazujući da su ispitivane krave bile optimalnog zdravstvenog stanja.

8. LITERATURA

1. Adamović M, Šamanc H, Kirovski D, Vujanac I, Valčić O, 2014, Uticaj mineralnih smeša sa puferskim dejstvom na mlečnost, sastav mleka, pH sadržaja buraga i koncentraciju pojedinih biohemijskih parametara krvi krava izloženih toplotnom stersu, Veterinarski glasnik 68, (1-2), 31-42.
2. Aisen P, Listowsky I, 1980, Iron transport and storage proteins, *Ann Rev Biochem*, 49, 357–393.
3. Akasha M, Anderson RR, 1984, Thyroxine and triiodothyronine in milk of cows, goats, sheep and guinea pigs, *Proc Exp Biol Med*, 177, 360.
4. Alexandrova M, Macho L, 1983, Glucocorticoids in human, cow and rat milk, *Endocrinol Exp*, 17 (3- 4), 183-189.
5. An MJ, Cheon JH, Kim SW, Park JJ, Moon, CM, Han SY, Kim ES, Kim TI, Kim WH, 2009, Bovine colostrum inhibits nuclear factor κ B-mediated proinflammatory cytokine expression in intestinal epithelial cells, *Nutr Res*, 29, 275–280.
6. Andjelić B, Djoković R, Cincović M, Bogosavljević-Bošković S, Petrović M, Mladenović J, Čukić A, 2022, Relationships between milk and blood biochemical parameters and metabolic status in dairy cows during lactation., *Metabolites*, 12 (8), 733.
7. Aranda P, Sanchez L, Perez MD, Ena JM, Calvo M, 1991, Insulin in bovine colostrum and milk: evolution throughout lactation and binding to caseins, *Journal of Dairy Science*, 74, 4320-5.
8. Arnold RR, Brewer M, Gauthier JJ, 1980, Bactericidal activity of human lactoferrin: Sensitivity of a variety of microorganisms, *Infect Immun*, 28, 893–898.
9. Bagwe S, Tharappel LJP, Kaur G, Buttar HS, 2015, Bovine colostrum: An emerging nutraceutical, *J Complement. Integr Med*, 12, 175–185.
10. Bagwe-Parab S, Yadav P, Kaur G, Tuli HS, Buttar HS, 2020, Therapeutic applications of human and bovine colostrum in the treatment of gastrointestinal diseases and distinctive cancer types: The current evidence, *Front Pharmacol*, 2020, 11, 1100.
11. Barrington GM, Besser TE, Davis WC, Gay CC, Reeves JJ, McFadden TB, 1997, Expression of immunoglobulin G1 receptors by bovine mammary epithelial cells and mammary leukocytes, *J Dairy Sci*, 80, 86–93.
12. Bartke A, Darcy J, 2017, GH and ageing: Pitfalls and new insights, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 31, 113–25.
13. Bar-Yoseph F, Lifshitz Y, Cohen T, 2013, Review of sn-2 palmitate oil implications for infant health, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 89, 139–143.
14. Bastian SEP, Dunbar AJ, Priebe IK, Owens PC, Goddard C, 2001, Measurement of betacellulin levels in bovine serum, colostrum and milk, *J.Endocrinol*, 168, 203–212.
15. Baumrucker CR, Blum JW, 1993 Insulin-like growth factor-I (IGF-I) in milk and dietary effect upon the neonate. In: Momex R, Jaffiol C, Leclere J (eds) *Progress in Endocrinology: The Proceedings of the Ninth International Congress of Endocrinology, Nice 1992*, The Parthenon Publishing Group, London, 435-444
16. Baxter RC, Zaltsman Z, Turtle JR, 1984, Immunoreactive somatomedin-c/insulin-like growth factor I and its binding protein in human milk, *J Clin Endocrinol Metab*, 58, 955–959.

17. Bobe G, Young JW, Beitz DC, 2004, Pathology, etiology, prevention, treatment of fatty liver in dairy cows, *J Dairy Sci*, 2004, 87, 3105–3124.
18. Boldogh I, Aguilera-Aguirre L, Bacsı A, Choudhury BK, Saavedra-Molina A, Kruzel M, 2008, Colostrin decreases hypersensitivity and allergic responses to common allergens, *Int Arch. Allergy Immunol*, 146, 289–306.
19. Bošnjaković D, Nedić S, Arsić S, Prodanović R, Vujanac I, Jovanović LJ, Stojković M, Jovanović IB, Djuricic I, Kirovski D, 2024, Effects of Brown Seaweed (*Ascophyllum nodosum*) Supplementation on Enteric Methane Emissions, Metabolic Status and Milk Composition in Peak-Lactating Holstein Cows, *Animals*, 14 (11), 1520.
20. Bronowicka-Kłys DE, Lianeri M, Jagodziński PP, 2016, The role and impact of estrogens and xenoestrogen on the development of cervical cancer, *Biomed Pharmacother*, 84, 1945-53.
21. Buckley JD, Brinkworth GD, Abbott MJ, 2003, Effect of bovine colostrum on anaerobic exercise performance and plasma insulin-like growth factor I, *J. Sports Sci*, 21, 577–588.
22. Capen CC, Martin SL, 1989, The thyroid gland. In *Veterinary endocrinology and reproduction*, fourth edition (ed. LE McDonald, MH Pineda), pp. 58–91. Lea and Febiger, Philadelphia, PA
23. Castigliero L, Li X, Armani A, Mazzi M, Guidi A, 2011, An immunoenzymatic assay to measure insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in buffalo milk with an IGF binding protein blocking pre-treatment of the sample, *International Dairy Journal*, 21, 421-6.
24. Chen B, Liu S, Xu W, Wang X, Zhao M, Wu J, 2009, IGF-I and IGFBP-3 and the risk of lung cancer: A meta-analysis based on nested case-control studies, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 28, 89.
25. Cherlet M, De Baere S, De Backer P, 2004, Quantitative determination of dexamethasone in bovine milk by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 805 (1):57-65.
26. Chopra IJ, Sack J, Fisher DA, 1975, T3 and rT3 in fetal and adult sheep: Studies of metabolic clearance rate, production rate, binding and thyroidal content relative to T4, *Endocrinology*, 97, 1080.
27. Cimmino F, Catapano A, Villano I, Di Maio G, Petrella L, Traina G, Pizzella A, Tudisco R, Cavaliere G., 2023, Invited review: Human, cowm and donkey milk comparison: focus on metabolic effects, *J Dairy Sci*, 106(5), 3072-3085.
28. Clare D, Catignani G, Swaisgood H, 2005, Biodefense Properties of Milk: The Role of Antimicrobial Proteins and Peptides, *Curr Pharm Des*, 9, 1239–1255.
29. Clatici VG, Voicu C, Voaides C, Roseanu A, Icriverzi M, Jurcoane S, 2018, Diseases of Civilization–Cancer, Diabetes, Obesity and Acne–the Implication of Milk, IGF-1 and mTORC1, *Mædica*, 13(4), 273-281.
30. Cleminson JS, Zalewski SP, Embleton ND, 2016, Nutrition in the preterm infant: What’s new?, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 19, 220–225.
31. Clemmons DR, Smith-Banks A, Underwood LE, 1992, Reversal of diet-induced catabolism by infusion of recombinant insulin-like growth factor-I in humans, *J Clin Endocrinol Metab*, 75, 234–238.
32. Clemmons DR, 1993, IGF binding proteins, and their functions, *Molecular Reproduction and Development*, 35, 368 –375.
33. Coelho AI, Berry GT, Rubio-Gozalbo ME, 2015, Galactose metabolism and health, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 18, 422–427.

34. Collier RJ, Hernandez LL, Laporta J, Lauderdale J, Zachary KS, Vicini JL, 2020, Impacts on Human Health and Safety of Naturally Occurring and Supplemental Hormones in Food Animals, CAST Commentaries.
35. Collier RJ, Miller MA, Hildebrandt JR, Torkelson AR, White TC, Madsen KS, Lanza GM, 1991, Factors affecting insulin-like growth factor-I concentration in bovine milk, *Journal of Dairy Science*, 74 (9), 2905-11.
36. Contarini G, Povolo M, Pelizzola V, Monti L, Bruni A, Passolungo L, Abeni F, Degano L, 2014, Bovine colostrum: Changes in lipid constituents in the first 5 days after parturition, *J Dairy Sci.*, 97, 5065–5072.
37. Conti E, Andreotti F, Sciahbasi A, Riccardi P, Marra G, Menini E, Maseri A, 2001, Markedly reduced insulin-like growth factor-1 in the acute phase of myocardial infarction, *Journal of the American College of Cardiology*, 38 (1), 26-32.
38. Coppa M, Ferlay A, Chassaing C, Agabriel C, Glasser F, Chilliard Y, Borreani G, Barcarolo R, Baars T, Kusche D, Harstad OM, Verbiş J, Golecký J, Martin B, 2013, Prediction of bulk milk fatty acid composition based on farming practices collected through on-farm surveys, *J Dairy Sci*, 96, 4197–4211.
39. Cowie AI, Forsyth LA, Hart IC, 1980, *Control of lactation*, Springer-Verlag, Berlin, FRG.
40. Cozzi G, Ravarotto L, Gottardo F, Stefani AL, Contiero B, Moro L, Brscic M, Dalvit P, 2011, Reference values for blood parameters in Holstein dairy cows: Effects of parity, stage of lactation, and season of production, *J Dairy Sci*, 94, 3895-3901.
41. Craninx M, Steen A, Van Laar H, Van Nespen T, Martin-Tereso J, De Baets B, Fievez V, 2008, Effect of lactation stage on the odd- and branched-chain milk fatty acids of dairy cattle under grazing and indoor conditions, *J Dairy Sci*, 91, 2662–2677.
42. Daniel H, Vohwinkel M, Rehner G, 1990, Effect of casein and β -casomorphins on gastrointestinal motility in rats, *J Nutr*, 120, 252–257.
43. Davison G, Jones AW, Marchbank T, Playford RJ, 2020, Oral bovine colostrum supplementation does not increase circulating insulin-like growth factor-1 concentration in healthy adults: results from short- and long-term administration studies, *Eur J Nutr*, 59, 4, 1473-1479.
44. Daxenberger A, Sauerwein H, Breier BH, 1998, Increased milk levels of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) for the identification of bovine somatotropin (bST) treated cows, *Analyst*, 123, 2429-35.
45. Dinarello CA, 1994, The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J.* 8, 1314–1325.
46. Douëllou T, Montel MC, Thevenot Sergentet, D, 2017, Invited review: Anti-adhesive properties of bovine oligosaccharides and bovine milk fat globule membrane-associated glycoconjugates against bacterial food enteropathogens, *J Dairy Sci*, 100, 3348–3359.
47. Eliassen AH, Hankinson SE, 2008, Endogenous hormone levels and risk of breast, endometrial and ovarian cancers: prospective studies, *Adv Exp Med Biol*, 630, 148-65.
48. Farlow DW, Xu X, Veenstra TD, 2012, Comparison of estrone and 17 β -estradiol levels in commercial goat and cow milk, *J Dairy Sci*, 95, 1699-708.
49. Ferlay A, Agabriel C, Sibra C, Journal C, Martin B, Chilliard Y, 2008, Tanker milk variability in fatty acids according to farm feeding and husbandry practices in a French semi-mountain area, *Dairy Sci Technol*, 88:193–215.

50. Fintini D, Brufani C, Cappa M, 2009, Profile of mecasermin for the long-term treatment of growth failure in children and adolescents with severe primary IGF-1 deficiency, *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 5, 553–559.
51. Forbes B, McCarthy P, Norton R, 2012, Insulin-like growth factor binding proteins: a structural perspective, *Frontiers in endocrinology*, 3, 38.
52. Fox L, Butler WR, Everett RW, Natzke RP, 1981, Effect of adrenocorticotropin on milk and plasma cortisol and prolactin concentrations. *J Dairy Sci*, 64, 9, 1794-1803.
53. Francis GL, Upton FM, Ballard FJ, McNeil KA, Wallace JC, 1988, Insulin-like growth factors 1 and 2 in bovine colostrum, *Biochem. J*, 251, 95–103
54. Fraser GE, Jaceldo-Siegl K, Orlich M, Mashchak A, Sirirat R, Knutsen S, 2020, Dairy, soy, and risk of breast cancer: those confounded milks, *Int J Epidemiol*, 49(5),1526–1537.
55. Fruchtman S, McVey DC, Borski RJ, 2002, Characterization of pituitary IGF-I receptors: modulation of prolactin and growth hormone, *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 283, 2, 468-476.
56. Fukasawa M, Tsukada H, Kosako T, Yamada A, 2008, Effect of lactation stage, season and parity on milk cortisol concentration in Holstein cows, *Livestock Sci*, 2008, 113, 2-3, 280-284.
57. Xu L, Zhang Y, Zhang Y, Meng J, Sheng Q, 2009, Compositions of cortisone and cortisol in colostrum of Holstein cows, *China Dairy Ind*, 2009, 37, 18–20.
58. Gadd JB, Tremblay LA, Northcott GL, 2010, Steroid estrogens, conjugated estrogens and estrogenic activity in farm dairy shed effluents, *Environ Pollut*, 158, 730-6
59. Gellrich K, Sigl T, Meyer HHD, Wiedeman S, 2015, Cortisol levels in skimmed milk during the first 22 weeks of lactation and response to short-term metabolic stress and lameness in dairy cows, *J Anim Sci Biotechnol*, 6, 31.
60. Ginger MR, Grigor MR, 1999, Comparative aspects of milk caseins, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 124, 133–145
61. Ginther OJ, Nuti L, Wentworth BC, Tyler WJ, 1974, Progesterone concentration in milk and blood during pregnancy in cows, *P Soc Exp Biol Med*, 146, 354-7.
62. Godden SM, Lombard JE, Woolums AR, 2019, Colostrum Management for Dairy Calves, *Vet Clin N Am Food Anim Pract*, 35, 535–556.
63. Goff JP, 2004, Macromineral disorders of the transition cow, *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 20, 3), 471-94
64. Gopal PK, Gill HS, 2000, Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum, *Br J Nutr*, 84, 69–74.
65. Gorewit RC, Tucker A, 1976, Comparison of binding proteins of glucocorticoids in mammary tissue and in blood sera from lactating cows, *J Dairy Sci*, 59, 7, 1247-1253.
66. Grgurevic N, Koracin J, Majdic G, Snoj T, 2016, Effect of dietary estrogens from bovine milk on blood hormone levels and reproductive organs in mice, *J Dairy Sci*, 99, 6005-13.
67. Grosvenor CE, Picciano MF, Baumrucker CR, 1992, Hormones and growth factors in milk, *Endocrine reviews*, 14, 6, 710-728
68. Guidi A, Castigliero L, Iannone G, Armani A, Gianfaldoni D, 2007, An immunoenzymatic method to measure IGF-1 in milk, *Veterinary Research Communications*, 31, 1, 373.
69. Guler HP, Schmid C, Zapf J, Froesch ER, 1989, Effects of recombinant insulin-like growth factor I on insulin secretion and renal function in normal human subjects, *Proc Natl Acad Sci USA*, 86, 2868–2872.

70. Guler HP, Zapf J, Froesch ER, 1987, Short-term metabolic effects of recombinant human insulin-like growth factor I in healthy adults, *N Engl J Med* 317, 137–140.
71. Gunzler O, Korndorfer L, Lohoff H, Hamburger R, Hoffmann B, 1975, Practical experience in determining progesterone in milk for evaluation of fertility in the cow, *Tierarztl Umsch*, 30, 3, 111-118.
72. Hadorn U, Hammon H, Bruckmaier RM, Blum JW, 1997, Delaying colostrum intake by one day has important effects on metabolic traits and on gastrointestinal and metabolic hormones in neonatal calves, *The Journal of nutrition*, 127, 2011-23.
73. Harrison S, Lennon R, Holly J, Higgins JPT, Gardner M, Perks C, Gaunt T, Tan V, Borwick C, Emmet P, Jeffreys M, Northstone K, Rinaldi S, Thomas S, Turner SD, Pease A, Vilenchick V, Martin RM, Lewis SJ, 2017, Does milk intake promote prostate cancer initiation or progression via effects on insulin-like growth factors (IGFs)? A systematic review and meta-analysis, *Cancer Causes Control*. 2017 Jun;28, 6, 497-528.
74. Hart I C, Bines JA, Morant SV, Ridley JL, 1978, Endocrine control of energy metabolism in the cow: Comparison of the levels of hormones (prolactin, growth hormone, insulin and thyroxine) and metabolites in the plasma of high and low-yielding cattle at various stages of lactation, *J Endocrinol*, 77,333
75. He F, Tuomola E, Arvilommi H, Salminen S, 2001, Modulation of human humoral immune response through orally administered bovine colostrum, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 31, 93–96.
76. Heap RB, Fleet IR, Hamon M, Brown KD, Stanley CJ, Webb AE, 1986, Mechanisms of transfer of steroid hormones and growth factors into milk, *Endocrinol Exp*, 20, 2-3, 101-118.
77. Heap RB, Holdsworth RJ, Gadsby JE, Laing JA, Walters DE, 1976, Pregnancy diagnosis in the cow from milk progesterone concentration, *Brit Vet J*, 132, 5, 445-64.
78. Heck JML, van Valenberg HJF, Dijkstra J, van Hooijdonk ACM, 2009, Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition, *J Dairy Sci*, 92, 4745–4755.
79. Heidegger I, Ofer P, Doppler W, Rotter V, Klocker H, Massoner, P, 2012, Diverse functions of IGF/insulin signaling in malignant and noncancerous prostate cells: Proliferation in cancer cells and differentiation in noncancerous cells, *Endocrinology* 153, 4633–4643.
80. Heyman MB, Committee on Nutrition, 2006, Lactose intolerance in infants, children, and adolescents, *Pediatrics*, 118, 3, 1279-86.
81. Hirschberg R., Brunori G., Kopple JD, Guler HP, 1993, Effects of insulin-like growth factor I on renal function in normal men, *Kidney Int*, 43, 387–397.
82. Hoffmann B, Hamburger R, Hollwich W, 1977, Determination of progesterone directly in milk fat as an improved method for fertility control in cattle, *Zuchthygiene*, 2, 1, 1-7.
83. Hoffmann B, Hamburger R, Karg H, 1975, Natural occurrence of progesterone in commercial milk products (author's transl), *Z Lebensm Unters Forsch*, 158, 5, 257-259.
84. Insel P, Turner RE, Ross D, 2004, Nutrition, Second Edition, American dietetic association, Jones and Bartlett, USA
85. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 2014, Residue Evaluation Of Certain Veterinary Drugs, WHO, 15.
86. Jones AW, March DS, Thatcher R, Diment B, Walsh NP, Davison G, 2019, The effects of bovine colostrum supplementation on in vivo immunity following prolonged exercise: A randomised controlled trial, *Eur J Nutr*, 58, 335–344.

87. Jouan PN, Pouliot Y, Gauthier SF, Laforest JP, 2006, Hormones in bovine milk and milk products: A survey, *Int Dairy J*, 16, 1408-14.
88. Kanwar, J, Kanwar R, Sun X, Punj V, Matta H, Morley S, Parratt A, Puri M, Sehgal R, 2009, Molecular and Biotechnological Advances in Milk Proteins in Relation to Human Health, *Curr Protein Peptide Sci*, 10, 308–338.
89. Kehoe SI, Jayarao BM, Heinrichs AJ, 2007, A survey of bovine colostrum composition and colostrum management practices on Pennsylvania dairy farms, *J Dairy Sci*, 90, 4108–4116.
90. Kelly GS, 2003, Bovine colostrum: A review of clinical uses, *Altern Med Rev*, 8, 378–394.
91. Kiewiet MBG, Dekkers R, Gros M, van Neerven RJJ, Groeneveld A, de Vos P, Faas MM, 2017, Toll-like receptor mediated activation is possibly involved in immunoregulating properties of cow's milk hydrolysates, *PLoS ONE*, 12, e0178191.
92. Kimura T, Murakawa Y, Ohno M, Ohtani S, Higaki K, 1997, Gastrointestinal absorption of recombinant human insulin-like growth factor-I in rats, *J Pharmacol Exp Ther*, 283, 611–618.
93. King JC, Cummings GE, Guo N, Trivedi L, Readmond BX, Keane V, Feigelman S, de Waard R, 2007, A double-blind, placebo-controlled, pilot study of bovine lactoferrin supplementation in bottle-fed infants, *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 44, 245–251.
94. Kirovski D, Lazarević M, Baričević-Jones I, Nedić O, Masnikosa R, Nikolić Judith A, 2008, Effects of peroral insulin and glucose on circulating Insulin-like growth factor-I, its binding proteins and thyroid hormones in neonatal calves, *Canadian Journal of Veterinary Research*, 72, 253-288.
95. Kirovski D., 2015, Endocrine and metabolic adaptations of calves to extra-uterine life, *Acta Veterinaria-Beograd*, 65 (3), 297-318.
96. Koldovský O, 1995, Hormones in milk, *Vitam Horm*, 50, 77-149.
97. Kruzel ML, Bacsı A, Choudhury B, Sur S, Boldogh I, 2006, Lactoferrin decreases pollen antigen-induced allergic airway inflammation in a murine model of asthma, *Immunology*, 119, 159–166.
98. Kruzel ML, Janusz M, Lisowski J, Fischleigh RV, Georgiades JA, 2001, Towards an understanding of biological role of colostrinin peptides, *J Mol Neurosci*, 17, 379–389.
99. Kuiken KA, Pearson PB, 1949, The essential amino acid (except tryptophan) content of colostrum and milk of the cow and ewe, *J Nutr*, 39, 167–176.
100. Larsen MK, Nielsen JH, Butler G, Leifert C, Slots T, Kristiansen GH, Gustafsson AH, 2010, Milk quality as affected by feeding regimens in a country with climatic variation, *J Dairy Sci*, 93, 2863–2873.
101. Laughlin GA, Barrett-Connor E, Criqui MH, Kritz-Silverstein D, 2004. The prospective association of serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-1 levels with all cause and cardiovascular disease mortality in older adults: the Rancho Bernardo Study, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89, 1, 114–20.
102. Locatelli V, Bianchi VE, 2014, Effect of GH/IGF-1 on bone metabolism and osteoporosis, *International journal of endocrinology*, 1-25.
103. Lombardi G, Tauchmanova L, Di Somma C, Musella T, Rota F, Savanelli MC, Colao A, 2005, Somatopause: dimetabolic and bone effects, *Journal of endocrinological investigation*, 28, 10, 36-42.
104. Lönnerdal, B, 2003, Nutritional and physiologic significance of human milk proteins, *Am J Clin Nutr*, 77, 1537S–1543S.

105. Lowe WL, 1991, Biological actions of the insulin-like growth factors. In *Insulin-like Growth Factors, Molecular and Cellular Aspects*; LeRoith, D., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 49–85.
106. Lukanova A, Lundin E, Michel A, Arslan A, Ferrari P, Rinaldi S, 2004, Circulating levels of sex hormones and risk of endometrial cancer in postmenopausal women, *Internat J Cancer*, 108, 425-32.
107. Luopajarvi K, Savilahti E, Virtanen SM, Ilonen J, Knip M, Åkerblom HK, Vaarala O, 2008, Enhanced levels of cow's milk antibodies in infancy in children who develop type 1 diabetes later in childhood, *Pediatr Diabetes*, 9, 5, 434-441.
108. Macdonald KA, Verkerk GA, Thorrold BS, Pryce JE, Penno JW, McNaughton LR, Burton LJ, Lancaster JAS, Williamson JH, Holmes CW, 2008, A comparison of three strains of Holstein-Friesian grazed on pasture and managed under different feed allowances, *J Dairy Sci*, 91, 1693–1707.
109. Malekinejad H, Rezabakhsh A, 2015, Hormones in dairy foods and their impact on public health-a narrative review article, *Iranian journal of public health*, 44, 6, 742.
110. Malekinejad H, Scherpenisse P, Bergwerff AA, 2006, Naturally occurring estrogens in processed milk and in raw milk (from gestated cows), *J Agric Food Chem*, 54, 9785-91.
111. Malven PV, Head HH, Collier RJ, Buonomo FC, 1987, Periparturient changes in secretion and mammary uptake of insulin and in concentrations of insulin and insulin-like growth factors in milk of dairy cows, *J Dairy Sci*, 70, 2254-2265.
112. Marín-Quiroga A, Villanueva-Fierro I, Rodríguez-Pérez MA, Lares-Asseff A, Cháirez Hernández I, Proal-Nájera JB, 2015, Association of IGF-1 content with whole, reduced-fat, and low-fat milk in México, *Agrociencia*, 49, 113–123
113. Masson PL, Heremans, JF, 1971, Lactoferrin in milk from different species, *Comparat Biochem Physiol Part B Biochem Physiol*, 39, IN11–IN13.
114. Matsumoto H, Shimokawa Y, Ushida Y, Toida T, Hayasawa H, 2001, New Biological Function of Bovine α -Lactalbumin: Protective Effect against Ethanol- and Stress-induced Gastric Mucosal Injury in Rats, *Biosci Biotechnol Biochem*, 65, 1104–1111.
115. Meister D, Bode J, Shand A, Ghosh S, 2002, Anti-inflammatory effects of enteral diet components on Crohn's disease-affected tissues in vitro, *Digest Liver Dis*, 34, 430–438.
116. Mekuriaw Y, 2023, Negative energy balance and its implication on productive and reproductive performance of early lactating dairy cows: review paper, *Journal of Applied Animal Research*, 51, 1, 220-228.
117. Melnik B, 2009, Milk consumption: aggravating factor of acne and promoter of chronic diseases of Western societies, *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 7, 4, 364-370.
118. Melnik B, John SM, Carrera-Bastos P, Cordain L, Leitzmann C, Weiskirchen R, Schmitz G, 2023, The role of cow's milk consumption in breast cancer initiation and progression, *Curr Nutr Rep*, 12, 1, 122-140.
119. Miell JP, Taylor AM, Jones J, Buchanan CR, Rennie J, Sherwood R, Leicester R, Ross RJ, 1992, Administration of human recombinant insulin-like growth factor-I to patients following major gastrointestinal surgery, *Clin Endocrinol (Oxf.)*, 37, 542–551
120. Miles, EA, Calder PC, 2017, The influence of the position of palmitate in infant formula triacylglycerols on health outcomes, *Nutr Res*, 44, 1–8.

121. Miller L, Hunt JS, 1996, Sex steroid hormones and macrophage function. *Life Sci*, 59, 1, 1-14.
122. Jung-Testas I, Do Thi A, Koenig H, Desarnaud F, Shazand K, Schumacher M, Baulieu EE, 1999, Progesterone as a neurosteroid: synthesis and actions in rat glial cells, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 69, 1-6, 97-107.
123. Monk EL, Erb RE, Mollett TA, 1975, Relationships between immunoreactive estrone and estradiol in milk, blood, and urine of dairy cows, *J Dairy Sci*, 58, 34-40.
124. Moretti P, Paltrinieri S, Trevisi E, Probo M, Ferrari A, Minuti A, Giordano A, 2017, Reference intervals for hematological and biochemical parameters, acute phase proteins and markers of oxidation in Holstein dairy cows around 3 and 30 days after calving, *Res Vet Sci*, 114, 322-331.
125. Morrin ST, Lane JA, Marotta M, Bode L, Carrington SD, Irwin JA, Hickey RM, 2019, Bovine colostrum-driven modulation of intestinal epithelial cells for increased commensal colonization, *Appl Microbiol Biotechnol*, 103, 2745–2758.
126. Nciuc NSTĂ, Râpeanu G, 2010, An overview of bovine α -lactalbumin structure and functionality, *Ann Univ Dunarea Jos Galati Fascicle VI Food Technol*, 34, 82–93.
127. Nedić S, Pantelić M, Vranješ-Đurić S, Nedić D, Jovanović Lj, Čebulj-Kadunc N, Kobal S, Tomaž S, Kirovski D, 2017, Cortisol concentration in hairm blood and milk in Holstein and Busha cows, *Slov Vet Res*, 54, 4, 163-172.
128. Nixon DA, Akasha MA, Anderson RR, 1988, Free and total thyroid hormones in serum of Holstein cows, *J of Dairy Sci*, 71, 1152-1160.
129. O’Callaghan TF, O’Donovan M, Murphy JP, Sugrue K, Mannion D, McCarthy WP, Timlin M, Kilcawley KN, Hickey RM, Tobin JT, 2020, Evolution of the bovine milk fatty acid profile-From colostrum to milk five days post parturition, *Int Dairy J*, 104, 8721–8731.
130. Oliveira MA, Osório MM, 2005, Cow`s milk consumption and iron deficiency anemia in children, *J Pediatr (Rio J)*, 81,5,361-367.
131. O’Riordan N, O’Callaghan J, Buttò LF, Kilcoyne M, Joshi L, Hickey RM, 2018, Bovine glycomacropptide promotes the growth of *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* and modulates its gene expression, *J Dairy Sci*, 101, 6730–6741.
132. Ochoa TJ, Chea-Woo E, Campos M, Pecho I, Prada A, McMahon RJ, Cleary TG, 2008, Impact of lactoferrin supplementation on growth and prevalence of *Giardia* colonization in children, *Clin Infect Dis*, 46, 1881–1883.
133. Ollikainen P, Muuronen K, 2013, Determination of insulin-like growth factor-1 and bovine insulin in raw milk and its casein and whey fractions after microfiltration and ultrafiltration, *International Dairy Journal*, 28, 83-7.
134. O’Neill C, Kiely AP, Coakley MF, Manning S, Long-Smith CM, 2012, Insulin and IGF-1 signalling: longevity, protein homeostasis and Alzheimer's disease, *Biochemical Society Transactions*, 40, 4, 721-727.
135. Ontsouka CE, Bruckmaier RM, Blum JW, 2003, Fractionized milk composition during removal of colostrum and mature milk, *Journal of Dairy Science*, 86, 2005-11.
136. Pakkanen R, Aalto J, 1997, Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum, *Int Dairy J*, 7, 285–297.

137. Palladino RA, Buckley F, Prendiville R, Murphy JJ, Callan J, Kenny DA, 2010, A comparison between Holstein-Friesian and Jersey dairy cows and their F1 hybrid on milk fatty acid composition under grazing conditions, *J Dairy Sci*, 93, 2176–2184
138. Pammi M, Suresh G, 2017, Enteral lactoferrin supplementation for prevention of sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants, *Cochrane Database Syst Rev*, 3, CD007137.
139. Pan'kiv AV, Simonov MR, 2020, The concentration of triiodothyronine and thyroxine in colostrum, milk and plasma of cows *Sci Mess LNU Vet Med Biotechnol*, 22, 98.
140. Panahi Y, Falahi G, Falahpour M, Moharamzad Y, Khorasgani MR, Beiraghdar F, Naghizadeh MM, 2010, Bovine colostrum in the management of nonorganic failure to thrive: A randomized clinical trial, *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 50, 551–554.
141. Paolisso G, Ammendola S, Del Buono A, Gambardella A, Riondino M, Tagliamonte MR, Rizzo MR, Carella C, Varricchio M, 1997, Serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 in healthy centenarians: relationship with plasma leptin and lipid concentrations, insulin action, and cognitive function, *J Clin Endocrinol Metab*, 82,7,2204-9.
142. Pape-Zambito DA, Magliaro AL, Kensinger R, 2008, 17 β -estradiol and estrone concentrations in plasma and milk during bovine pregnancy, *J Dairy Sci*, 91, 127-35.
143. Pape-Zambito DA, Magliaro AL, Kensinger RS, 2007, Concentrations of 17 β -estradiol in Holstein whole milk. *J Dairy Sci*, 90, 3308-3313.
144. Pape-Zambito DA, Roberts RF, Kensinger RS, 2010, Estrone and 17 beta-estradiol concentrations in pasteurized-homogenized milk and commercial dairy products, *J Dairy Sci*, 93, 2533–2540.
145. Parodi PW, 2012, Impact of cows' milk estrogen on cancer risk, *Int Dairy J*, 22, 3-14.
146. Paronen J, Knip M, Savilahti E, Virtanen SM, Ilonen J, Akerblom HK, Vaarala O, 2000, Effect of cow's milk exposure and maternal type 1 diabetes on cellular and humoral immunization to dietary insulin in infants at genetic risk for type 1 diabetes. Finnish Trial to Reduce IDDM in the Genetically at Risk Study Group, *Diabetes*, 49, 1657–1665.
147. Pereira PC, 2014, Milk nutritional composition and its role in human health, *Nutrition*, 30, 619–627.
148. Pessi T, Isolauri E, Sütas Y, Kankaanranta H, Moilanen E, Hurme M, 2001, Suppression of T-cell activation by *Lactobacillus rhamnosus* GG-degraded bovine casein, *Int Immunopharmacol*, 1, 211–218.
149. Pezzi CA, Accorsi P, Vigo D, Govoni N, Gaiani R, 2003, 5'-Deiodinase Activity and Circulating Thyronines in Lactating Cows, *J Dairy Sci*, 86, 152–158.
150. Philipps AF, Rao R, Anderson GG, McCracken DM, Lake M, Koldovsky O, 1995, Fate of insulin-like growth factors I and II administered orogastrically to suckling rats, *Pediatr Res*, 37, 586–592.
151. Piccand, V, Cutullic E, Meier S, Schori F, Kunz PL, Roche JR, Thomet P, 2013, Production and reproduction of Fleckvieh, Brown Swiss, and 2 strains of Holstein-Friesian cows in a pasturebased, seasonal-calving dairy system, *J Dairy Sci*, 96, 5352–5363.
152. Plaut K, Bauman DE, Agergaard N, 1985, Effect of exogenous prolactin on lactational performance of dairy cows, *J Dairy Sci* 68 (Suppl. 1), 169.

153. Playford RJ, Weiser MJ, 2021, Bovine Colostrum: Its Constituents and Uses, *Nutrients*, 13, 1, 265.
154. Playford RJ, Macdonald CE, Calnan DP, Floyd DN, Podas T, Johnson W, Wicks AC, Bashir O, Marchbank T, 2001, Coadministration of the health food supplement, bovine colostrum, reduces the acute non-steroidal anti-inflammatory drug-induced increase in intestinal permeability, *Clin Sci*, 100, 627–633.
155. Playford RJ, Woodman AC, Vesey D, Deprez PH, Calam J, Watanapa P, Williamson RCN, Clark, P, 1993, Effect of luminal growth factor preservation on intestinal growth, *Lancet* 1993, 341, 843–848.
156. Prodanović R, Kirovski D, Jakić-Dimić D, Vujanac I, Kureljušić B, 2010, Telesna kondicaija i polazatelji energetskeg statusa krava u vosokom graviditetu i ranoj fazi laktacije, *Veterinarski glasnik*, 64, 1-2, 43-52
157. Qin L, He K, Xu J, 2009, Milk consumption and circulating insulin-like growth factor-I level: A systematic literature review, *Int J Food Sci Nutr*, 60, 330-340.
158. Qu X, Su C, Zheng N, Li S, Meng L, Wang J, 2018, A survey of naturally-occurring steroid hormones in raw milk and the associated health risks in Tangshan city, Hebei province, China, *Int J Environ Res Public Health*, 15,38.
159. Lobo RR, Arce-Cordero JA, So S, Soltis M, Nehme M, Marinho M, Agostinho BC, Ravelo AD, Vinyard JR, Johnson ML, Monteiro HF, Sarmikasoglou E, Faciola AP, 2023, Production, physiological response, and calcium and magnesium balance of lactating Holstein cows fed different sources of supplemental magnesium with or without ruminal buffer, *J Dairy Sci*, 106, 2, 990-1001
160. Ragab SS, Ibrahim MK, 2004, Role of Bovine Colostrum and its Biofunctional Fraction PRP in Oral Treatment of Enterogenic Endotoxaemia in Rats, *Int J Agric Biol*, 6, 576–580.
161. Rathe M Müller K, Sangild PT, Husby S, 2014, Clinical applications of bovine colostrum therapy: A systematic review, *Nutr Rev*, 72, 237–254.
162. Rattray, M, 2005, Technology evaluation: Colostrinin, *ReGen*, *Curr Opin Mol Ther*, 2005, 7, 78–84.
163. Vass RA, Kiss G, Bell EF, Miseta A, Bódis J, Funke S, Bokor S, Molnár D, Kósa B, Kiss AA, Takács T, Dombai F, Ert T, 2022, Thyroxine and Thyroid-Stimulating Hormone in Own Mother’s Milk, Donor Milk, and Infant Formula, *Life*, 12, 584, 1-9.
164. Reksen O, Grohn YT, Havrevoll O, Bolstad T, Waldmann A, Ropstad E, 2002, Relationships among milk progesterone, concentrate allocation, energy balance, milk yield and conception rate in Norwegian cattle, *Anim Reprod Sci*, 73, 3-4, 169- 184
165. Renaville R, Hammadi M, Portetelle D, 2002, Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism, *Domestic animal endocrinology*, 23, 1-2, 351-360.
166. Renehan AG, Zwahlen M, Minder C, O’Dwyer ST, Shalet SM, Egger M, 2004, Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: Systematic review and meta-regression analysis, *The Lancet*, 363, 9418, 1346–1353.
167. Rinaldi S, Cleveland R, Norat T, Biessy C, Rohrmann S, Linseisen J, Boeing H, Pischon T, Panico S, Agnoli C, Palli D, Tumino R, Vineis P, Peeters PHM, Van Gils CH, Bueno-de-Mesquita BH, Vrieling A, Allen NE, Roddam A, Bingham S, Khaw KT, Manjer J, Borgquist S, Dumeaux V, Gram IT, Lund E, Trichopoulou A, Makrygiannis G, Benetou V, Molina E, Suárez ID, Gurrea AB, Gonzalez CA, Tormo MJ, Altzibar JM, Olsen A, Tjønneland A,

- Grønbaek H, Overvad K, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Morois S, Slimani N, Boffetta P, Jenab M, Riboli E, Kaaks R, 2010, Serum levels of IGF-I, IGFBP-3 and colorectal cancer risk: Results from the EPIC cohort, plus a meta-analysis of prospective studies, *International Journal of Cancer*, 126, 1702–1715.
168. Rioux P, Rajotte D, 2004, Progesterone in milk: a simple experiment illustrating the estrous cycle and enzyme immunoassay, *Adv Physiol Educ*, 28, 1-4, 64-67.
169. Ross M, Francis GL, Szabo L, Wallace JC, Ballard FJ, 1989, Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins inhibit the biological activities of IGF-1 and IGF-2 but not des- (1-3)-IGF-1, *Biochem J*, 258, 267–272.
170. Sales-Campos H, Reis de Souza P, Crema Peghini B, Santana da Silva J, Ribeiro Cardoso C, 2013, An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease, *Mini Rev Med Chem*, 13, 201–210.
171. Šamanc H, Kirovski D, Dimitrijević B, Vujanac I, Damnjanović Z, Polovina M, 2006, Procena energetskog statusa krava u laktaciji određivanjem koncentracije organskih sastojaka mleka, *Veterinarski glasnik*, 60, 5-6, 283-297.
172. Šamanc H, Stojić V, Kirovski D, Pušić M, Jakić-Dimić Dobrila, Vujanac I, 2009a, Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and thyroid hormone concentrations in colostrum of Holstein-Friesian cows before and after calving, *Acta Veterinaria Beograd*, 59, 17-23.
173. Šamanc H., Kirovski D., Prodanović R., Vujanac I., Sladojević Ž, 2009b, Koncentracija proteina, bilirubina i glukoze u krvi krava sa dislokacijom sirišta na levo, *Veterinarski glasnik*, 63 (3-4), 171-176.
174. Sanchez L, Aranda P, Perez M, Calvo M, 1988, Concentration of lactoferrin and transferrin throughout lactation in cow's colostrum and milk, *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 369, 1005–1008.
175. Saraiva M., Vieira P, O'Garra, A, 2020, Biology and therapeutic potential of interleukin-10, *J Exp Med*, 217, e20190418.
176. Saxelin M, Korpola R, Mayra-Makinen A, 2003, Introduction: classifying functional dairy products, In *Functional dairy products*, Edited by: Mattila-Sandholm T, Saarela M, Woodhead Publishnig Limited, UK, 1-16.
177. Scavo LM, Karase M, Murry M, Leroith D, 2004, Insulin-like growth factor-I stimulates both cell growth and lipogenesis during differentiation of human mesenchymal stem cells into adipocytes, *J Clin Endocrinol Metab*, 84, 3543–53.
178. Schams D, Karg H, 1986, Hormones in milk. *Ann N Y Acad Sci*, 464, 75-86
179. Schams D, Einspanier R, 1991, Growth hormone, IGF-I and insulin in mammary gland secretion before and after parturition and possibility of their transfer into the calf, *Endocr Regul*, 25, 139–143.
180. Schwalm JW, Kirk J, Secrest S, Tucker HA, 1978, Effects of processing milk on concentrations of glucocorticoids in milk, *J Dairy Sci*, 61, 10, 1517- 1518.
181. Schwalm JW, Schultz H, 1975, Relationship of insulin concentration to blood metabolites in dairy cows, *J Dairy Sci*, 59, 2, 255-261
182. Schwalm JW, Tucker A, 1978, Glucocorticoids in mammary secretions and blood serum during reproduction and lactation and distributions of glucocorticoids, progesterone, and estrogens in fractions of milk, *J of Dairy Sci*, 61, 5, 550-60.

183. Seifu E, Buys EM, Donkin EF, 2005, Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: A review, *Trends Food Sci. Technol*, 16, 137–145.
184. Shen WH, Xu RJ, 2000, Stability of insulin-like growth factor I in the gastrointestinal lumen in neonatal pigs, *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr*, 30,3,299-304.
185. Silva JE, 2005, Thyroid hormone and the energetic cost of keeping body temperature, *Bioscience Reports*, 25, 129–148.
186. Simonov M, Vlizlo V, Stybel V, Peleno R , Salata V, Matviishyn T, Khimych M, Gorobei O, 2021, Levels of insulin-like growth factor in bovine, goat, and sheep milk in different lactation periods: The etiological factor of cancer in humans, *Int J One Health*, 7, 14.
187. Slenodziński AB, Nowak J, Gawecka H, Sechman A, 1986, Thyroid hormones and insulin in milk: a comparative study, *Endocrinol Exp*, 20, 2-3, 247-255.
188. Snoj T, Majdič G, 2018, Mechanisms in Endocrinology: Estrogens in consumer milk: is there a risk to human reproductive health?, *Eur J Endocrinol*, 179, 275-86.
189. Snoj T, Zuzek MC, Cebulj-Kadunc N, Majdic G, 2018, Heat treatment and souring do not affect milk estrone and 17 β -estradiol concentrations, *J of Dairy Sci*, 101, 1, 61-5.
190. Soerensen KV, Thorning TK, Astrup A, Kristensen M, Lorenzen JK, 2014, Effect of dairy calcium from cheese and milk on fecal fat excretion, blood lipids, and appetite in young men, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99, 984-991.
191. Soyeurt H, Dardenne P, Gillon A, Croquet C, Vanderick S, Mayeres P, Bertozzi C, Gengler N, 2006. Variation in fatty acid contents of milk and milk fat within and across breeds, *J Dairy Sci*, 89, 4858–4865.
192. Soyeurt H, Dardenne P, Dehareng F, Bastin C, Gengler N, 2008. Genetic parameters of saturated and monounsaturated fatty acid content and the ratio of saturated to unsaturated fatty acids in bovine milk, *J Dairy Sci*, 91, 3611–3626.
193. Stelwagen K, Carpenter E, Haigh B, Hodgkinson A, Wheeler TT, 2009, Immune components of bovine colostrum and milk, *J Anim Sci*, 87, 3–9.
194. Stergiadis S, Seal CJ, Leifert C, Eyre MD, Larsen MK, Butler G, 2013, Variation in nutritionally relevant components in retail Jersey and Guernsey whole milk, *Food Chem*, 139, 540–548.
195. Stoop WM, Bovenhuis H, Heck JML, van Arendonk JAM, 2009. Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian cows, *J Dairy Sci*, 92, 1469– 1478.
196. Suh DY, Hunt TK, Spencer EM, 1992, Insulin-like growth factor-I reverses the impairment of wound healing induced by corticosteroids in rats, *Endocrinol*, 131, 2399–2403.
197. Sutariya S, Sunkesula V, Kumar R, Shah K, 2018, Review: Milk and milk products, insulin-like growth factor-1 and cancer, *EC Nutrition*, 13, 696-705.
198. Taaffe DR, Jin IH, Vu TH, Hoffam AR, Marcus R, 1996, Lack of effect of recombinant human growth hormone (GH) on muscle morphology and GH-insulin-like growth factor expression, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81, 421-425.
199. Tacket CO, Binion SB, Bostwick E, Losonsky G, Roy MJ, Edelman R, 1992, Efficacy of bovine milk immunoglobulin concentrate in preventing illness after *Shigella flexneri* challenge, *Am J Trop Med Hyg*, 47, 276–283.

200. Tate PL, Bibb R, Larcom LL, 2011, Milk stimulates growth of prostate cancer cells in culture, *Nutrition and cancer*, 63, 8, 1361-1366.
201. Ten Bruggencate SJ, Bovee-Oudenhoven IM, Feitsma AL, van Hoffen E, Schoterman MH, 2014, Functional role and mechanisms of sialyllactose and other sialylated milk oligosaccharides, *Nutr Rev*, 72, 377–389.
202. Thorning TK, Raben A, Tholstrup T, Soedamah-Muthu SS, Givens I, Astrup A, 2016, Milk and dairy products-good or bad for human health? An assessment of the totalizt of scientific evidence, *Food and Nutrition Research*, 60, 32527.
203. Thornton KJ, Kamange-Sollo E, White ME, Dayton WR, 2016, Active G protein-coupled receptors (GPCR), matrix metalloproteinases 2/9 (MMP2/9), heparin-binding epidermal growth factor (hbEGF), epidermal growth factor receptor (EGFR), erbB2, and insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) are necessary for trenbolone acetate-induced alterations in protein turnover rate of fused bovine satellite cell cultures, *J Anim Sci*, 94, 2332- 2343.
204. Tollefsen S, Arentz-Hansen H, Fleckenstein B, Molberg O, Ráki M, Kwok WW, Jung G, Lundin KEA, Sollid LM, 2006, HLA-DQ2 and -DQ8 signatures of gluten T cell epitopes in celiac disease, *J Clin Invest*, 116, 2226-2236
205. Trifković J, Jovanović Lj, Bošnjaković D, Savić Đ, Stefanović S, Krajišnik T, Sladojević Ž, Kirovski D, 2021, Summer season related heat stress affects the mineral composition of Holstein dam`s colostrum and neonatal calves` mineral status and hematological profile, *Biol Trace Elem Res*, <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02834-8>
206. Trifković J, Jovanović Lj, Đurić M, Stevanović-Đorđević S, Milanović S, Lazarević M, Sladojević Ž, Kirovski D, 2018, Influence of sesonal variations during late gestation on Holstein cow`s colostrum and postnatal adaptive capability of their calves, *Int J Biometeorol*, 62, 6, 1097-1108.
207. Ulfman LH, Leusen JHW, Savelkoul HFJ, Warner JO, van Neerven RJJ, 2018, Effects of Bovine Immunoglobulins on Immune Function, Allergy, and Infection, *Front Nutr*, 5, 1–20.
208. Ungvari Z, Csiszar A, 2012, The emerging role of IGF-1 deficiency in cardiovascular aging: recent advances, *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 67, 6, 599-610.
209. Urashima T, Saito T, Nakamura T, Messer M, 2001, Oligosaccharides of milk and colostrum in non-human mammals, *Glycoconj J*, 18, 357–371.
210. Vaarala O, Ilonen J, Ruohtula T, Pesola J, Virtanen SM, Härkönen T, Koski M, Kallioinen H, Tossavainen O, Poussa T, Järvenpää AL, Komulainen J, Lounamaa R, Åkerblom HK, Knip M, 2012, Removal of bovine insulin from cow’s milk formula and early initiation of beta-cell autoimmunity in the FINDIA pilot study, *Arch Pediatr Adolesc Med*, 6, 7.
211. Vacher PY, Blum, JW, 1993, Age dependency of insulin like growth factor 1, insulin protein and immunoglobulin concentrations and gamma glutamyl transferase activity in first colostrum of dairy cows, *Milchwissenschaft* 48, 423–425.
212. Van Hese K, Goossens L, Vandaele, G. Opsomer, 2020, Invited review: MicroRNAs in bovine colostrum—Focus on their origin and potential health benefits for the calf, *J Dairy Sci*, 103, 1–15.
213. Ventura ER, Konigorski S, Rohrmann S, Schneider H, Stalla GK, Pischon T, Linseisen J, Nimptsch K, 2019, Association of dietary intake of milk and dairy products with blood

- concentrations of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in Bavarian adults, *Eur J Nutr*, 59, 1413-1420.
214. Verardo V, Gómez-Caravaca AM, Arráez-Román D, Hettinga K, 2017, Recent advances in phospholipids from colostrum, milk and dairy by-products, *Int J Mol Sci*, 18, 173.
215. Vicini J, Etherton T, Kris-Etherton P, Ballam J, Denham S, Staub R, Goldstein D, McGrath MC, Lucy M, 2008, Survey of retail milk composition as affected by label claims regarding farmmanagement practices, *J Am Diet Assoc*, 108, 1198–1203.
216. Vitale G, Barbieri M, Kamenetskaya M, Paolisso G, 2017. GH/IGF-I/insulin system in centenarians, *Mechanisms of Ageing and Development*, 165, 107–114.
217. Westwood AJ, Beiser A, DeCarli C, Harris TB, Chen TC, He XM, Roubenoff R, Pikula A, Au R, Braverman LE, Wolf PA, Vasan RS, Seshadri S, 2014, Insulin-like growth factor-1 and risk of Alzheimer dementia and brain atrophy, *Neurology*, 82, 18, 1613-1619.
218. Wheeler TT, Hodgkinson AJ, Prosser CG, Davis SR, 2007, Immune components of colostrum and milk—A historical perspective, *J Mammary Gland Biol, Neoplasia*, 12, 237–247.
219. Wilson AJ, Byron K, Gibson, PR, 1999, Interleukin-8 stimulates the migration of human colonic epithelial cells in vitro, *Clin Sci*, 97, 385–390.
220. Wolford ST, Argoudelis CJ, 1979, Measurement of estrogens in cow's milk, human milk, and dairy products, *J Dairy Sci*, 62, 9, 1458-63.
221. Xian CJ, Shoubridge CA, Read LC, 1995, Degradation of IGF-I in the adult rat gastrointestinal tract is limited by a specific antiserum or the dietary protein casein, *J Endocrinol*, 146, 215–225
222. Yan J, Charles JF, 2018, Gut microbiota and IGF-1, *Calcif Tissue Int*, 102, 406–414.
223. Youssef M, El-Ashker M, 2017, Significance of insulin resistance and oxidative stress in dairy cattle with subclinical ketosis during the transition period., *Trop Anim Health Prod*, 49, 2, 239-244.
224. Zablocka A, Sokołowska A, Macała J, Bartoszevska M, Mitkiewicz M, Janusz M, Wilusz T, Polanowski A, 2020, Colostral proline-rich polypeptide complexes. Comparative study of the antioxidant properties, cytokine-inducing activity, and nitric oxide release of preparations produced by a laboratory and a large-scale method, *Int J Peptide Res Ther*, 26, 685–694.
225. Zelányi S, 2001, Progesterone and ovulation, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 98, 2, 152-9.
226. Zhao X, Xu XX, Liu Y, Xi EZ, An JJ, Tabys D, Liu N, 2019, The in vitro protective role of bovine lactoferrin on intestinal epithelial barrier, *Molecules*, 24, 148.
227. Zinicola M, Bicalho RC, 2019, Association of peripartum plasma insulin concentration with milk production, colostrum insulin levels, and plasma metabolites of Holstein cows, *Journal of Dairy Science*, 102, 2, 1473-82.
228. Zivkovic AM, Barile D, 2011, Bovine milk as a source of functional oligosaccharides for improving human health, *Adv Nutr*, 2, 284–289.

BIOGRAFIJA

Dragan Knežević je 2006. godine diplomirao na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu sa prosečnom ocenom 8,7, čime je stekao zvanje diplomirani veterinar. Akademske specijalističke studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisao je 2016. godine i uspešno završio 2017. godine sa prosečnom ocenom 9,25, čime je stekao zvanje doktor veterinarske medicine - specijalista. Doktorske akademske studije je upisao 2019. godine na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. U periodu od 2007. do 2009. godine bio je Rukovodilac kancelarije za unos podataka (KUP) Bijeljina, a od 2009. do 2016. godine bio je Upravnik veterinarske ambulante u okviru A.D. Veterinarska stanica Bijeljina. U periodu od 2006. do 2017. godine bio je stručni saradnik u Laboratoriji za dijagnostiku zaraznih bolesti, odeljenje Bijeljina, a od 2017. godine, pored toga što obavlja poslove Rukovodioca u Laboratoriji za dijagnostiku zaraznih bolesti, odeljenje Bijeljina, angažovan je i kao Zamenik rukovodioca laboratorije za bezbednost hrane, odeljenje Bijeljina. Služi se engleskim jezikom na nivou B1 (razumevanje), odnosno A2 (pisanje i govor). Učesnik je projekta Ministarstva nauke i tehnologije Republike Srpske pod nazivom: „Hormoni u mlijeku krava-značaj za procjenu zdravlja krava kao i stepena rizika za zdravlje ljudi“ (broj projekta: 19.032/961-71/19). Objavio je, kao koautor, dva saopštenja na skupovima nacionalnog značaja:

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Драган Љ. Кнежевић

број уписа 5008/19

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Испитивање фактора који утичу на заступљеност хормона у сировом и конзумном млеку крава

- 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, 3.3.2025.

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Драган Љ. Кнежевић**

Број уписа **5008/19**

Студијски програм **Докторске академске студије ветеринарске медицине**

Наслов рада **Испитивање фактора који утичу на заступљеност хормона у сировом и конзумном млеку
крава**

Ментор **Данијела Кировски и Жељко Сладојевић**

Потписани **Драган Љ. Кнежевић**

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, 3.3.2025.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

ИСПИТИВАЊЕ ФАКТОРА КОЈИ УТИЧУ НА ЗАСТУПЉЕНОСТ ХОРМОНА У СИРОВОМ И КОНЗУМНОМ МЛЕКУ КРАВА

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, 3.3.2025.
