

**UNIVERZITET U BEOGRADU**  
**FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE**

**Đorđe B. Savić**

**UTICAJ PREPARTALNE APLIKACIJE  
PROPILTIOURACILA NA ENDOKRINI  
I METABOLIČKI STATUS JUNICA  
HOLŠTAJN RASE**

**doktorska disertacija**

**Beograd, 2012.**

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

**Đorđe B. Savić**

**EFFECT OF PREPARTAL  
PROPYLTHIOURACIL APPLICATION  
ON ENDOCRINE AND METABOLIC  
STATUS OF HOLSTEIN HEIFERS**

**PhD Thesis**

**Belgrade, 2012.**

Doprinos u nastanku ove doktorske disertacije dali su mnogi meni dragi i važni ljudi, svako od njih na svoj način. Svima njima dugujem zahvalnost.

Mentoru, prof. dr Danijeli Kirovski, zahvaljujem se, prije svega, na ogromnom strpljenju i razumijevanju koje je imala za mene tokom zajedničkog rada na ovom istraživanju.

Svim članovima Komisije zahvaljujem se na brojnim i korisnim sugestijama, koje su mi pomogle u radu i doprinijele da ova disertacija bude bolja. Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr Horei Šamancu, koji mi je svojim savjetima i velikim kliničkim iskustvom pomogao da razumijem problem na kome smo radili i njegovo rješavanje.

Prof. dr Dragutinu Matarugiću zahvaljujem na tome što je imao razumijevanja i strpljenja za mene i vrijeme koje mi je bilo neophodno da se posvetim ovom radu.

Zahvaljujem se svojoj porodici, koja mi je sve ovo vrijeme bila nesebična podrška u svakom pogledu, kao i svima ostalim koji su na bilo koji način pomogli nastanak ovog rada.

## **Mentor**

**Prof. dr Danijela Kirovski, vanredni profesor**

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

## **Članovi Komisije**

**Prof. dr Horea Šamanc, redovni profesor**

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

**Prof. dr Miodrag Lazarević, redovni profesor**

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

**Prof. dr Milijan Jovanović, redovni profesor**

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

**Prof. dr Dragutin Matarugić, redovni profesor**

Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Banjaluci

**Datum odbrane doktorske disertacije**

.....



# UTICAJ PREPARTALNE APLIKACIJE PROPILTIOURACILA NA ENDOKRINI I METABOLIČKI STATUS JUNICA HOLŠTAJN RASE

## REZIME

Cilj ove doktorske disertacije bio je da se ispita uticaj prepartalne aplikacije propiltiouracila na endokrini i metabolički status junica holštajn rase u kasnom graviditetu i ranoj laktaciji. Ispitivanje je sprovedeno na ukupno 30 junica holštajn rase, odabranih u visokom graviditetu. Obje grupe junica su hranjene obrokom prilagođenim potrebama za graviditet, odnosno laktaciju. Junice ogledne grupe su u cilju indukcije hipotireoze od 20. dana prije očekivanog teljenja do dana teljenja svakodnevno peroralno tretirane sa 4 mg PTU/kg tjelesne mase, pomiješanog sa 25 ml maltoznog sirupa. Junice kontrolne grupe su svakodnevno primale samo 25 ml maltoznog sirupa. Uzorci krvi uzeti su punkcijom *v. jugularis* 20 dana prije očekivanog termina teljenja, 3 i 7 dana kasnije, svakodnevno tokom pet dana prije i pet dana nakon teljenja, a zatim 7., 15., 30. i 60. dana nakon teljenja. Uzorci tkiva jetre uzeti su od svih junica perkutanom biopsijom 7. dana prije očekivanog teljenja i 7. dana nakon teljenja. U svim uzetim uzorcima krvi određene su koncentracije  $T_4$ ,  $T_3$ , insulina i glukoze. Na osnovu koncentracije insulina i glukoze izračunata je vrijednost HOMA indeksa za sve periode uzorkovanja. U uzorcima uzetim 20., 17., 13., 7. i 4. dana prije i 7., 30. i 60. dana nakon teljenja određena je koncentracija IGF-I, a u uzorcima uzetim 20. i 7. dana prije i 7. i 30. dana nakon teljenja relativna zastupljenost IGFBP-2, IGFBP-3 i IGFBP-4. U uzorcima uzetim 20., 17., 13., 7., 4. i 1. dana prije, i 1., 3., 5., 7., 15., 30. i 60. dana nakon teljenja određene su koncentracije BHBA i ukupnog bilirubina. U uzorcima uzetim 20., 17., 13., 7. i 4. dana prije, na dan teljenja, kao i 3., 4., 7., 15., 30. i 60. dana nakon teljenja određene su koncentracije ukupnih proteina i albumina. U uzetim uzorcima tkiva jetre određena je aktivnost dejodinaza, stepen zamašćenja jetre i sadržaj glikogena. Dnevna proizvodnja mlijeka praćena je u periodu od 7. do 60. dana laktacije, a trajanje servis perioda je izračunato na osnovu podataka sa farme.

Tokom tretmana sa PTU kod junica ogledne grupe ustanovljeno je statistički značajno opadanje koncentracije  $T_4$ ,  $T_3$ , BHBA i aktivnosti DIO1 u tkivu jetre, te

statistički značajan porast koncentracije insulina, IGF-I i glukoze u odnosu na junice kontrolne grupe. Nakon prestanka tretmana kod junica ogledne grupe došlo je do privremenog i statistički značajnog povišenja koncentracije  $T_4$ ,  $T_3$  i aktivnosti DIO1 u odnosu na prepartalne vrijednosti, dok je kod junica kontrolne grupe istovremeno ustanovljen trend opadanja. Koncentracije insulina, IGF-I i glukoze kod junica ogledne grupe ostale su statistički značajno više u odnosu na kontrolnu grupu i tokom postpartalnog perioda. Postpartalna koncentracija BHBA kod junica ogledne grupe bila je statistički značajno niža u odnosu na junice kontrolne grupe sve do 5. dana nakon teljenja, a zatim statistički značajno viša od 15. dana nakon teljenja do kraja ispitivanog perioda. Kod junica ogledne grupe vrijednost HOMA indeksa je tokom cijelog ispitivanog perioda bila viša u odnosu na kontrolnu, iako su statistički značajne razlike postojale samo u periodu od 13. dana prije do 3. dana nakon teljenja. Odnos DIO1/DIO3 kod ogledne grupe junica je rastao od prepartalnog prema postpartalnom periodu ( $0,57 \pm 0,28$  naprema  $3,03 \pm 1,53$ ), dok je kod junica kontrolne grupe ustanovljeno njegovo smanjenje ( $1,90 \pm 1,09$  naprema  $1,75 \pm 1,03$ ). Kod junica ogledne grupe relativna zastupljenost IGFBP-2 i IGFBP-4 je blago porasla od prepartalnog ka postpartalnom periodu, dok je kod junica kontrolne grupe ustanovljen statistički značajan porast njihove relativne zastupljenosti. Relativna zastupljenost IGFBP-3 kod junica ogledne grupe je rasla od prepartalnog prema postpartalnom periodu, dok je kod junica kontrolne grupe ustanovljen trend opadanja. Koncentracije ukupnih proteina i albumina su kod junica ogledne grupe bile više u odnosu na kontrolnu grupu tokom cijelog ispitivanog perioda, iako je statistička značajnost razlika postojala samo u pojedinim periodima ispitivanja. Koncentracija ukupnog bilirubina kod junica ogledne grupe bila je statistički značajno viša u odnosu na kontrolnu samo u periodu od 13. dana prije teljenja do dana teljenja, dok u ostalim periodima ispitivanja nisu ustanovljene statistički značajne razlike. U uzorcima tkiva jetre uzetim prije teljenja, ni kod jedne grupe junica nije ustanovljeno zamašćenje, a sadržaj glikogena u hepatocitima je bio nešto veći kod junica ogledne grupe. U uzorcima tkiva jetre uzetim nakon teljenja, kod junica kontrolne grupe ustanovljeni su umjeren stepen zamašćenja ( $20,25 \pm 6,51\%$  masti) i smanjen sadržaj glikogena, a kod junica ogledne grupe blagi stepen zamašćenja ( $6,70 \pm 4,45\%$  masti), dok je sadržaj glikogena je ostao na visokom nivou. Razlika u stepenu postpartalnog zamašćenja jetre između ogledne i kontrolne grupe bila je

statistički značajna. Dnevna mliječnost junica ogledne grupe bila je statistički značajno niža u periodu od 7. do 12. dana laktacije, a od 41. dana laktacije do kraja ispitivanog perioda statistički značajno viša u odnosu na junice kontrolne grupe. Junice ogledne grupe su imale kraći servis period u odnosu na junice kontrolne grupe, iako nije ustanovljena statistička značajnost razlika.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da pojačana aktivnost tireoidee u ranom postpartalnom periodu može doprinijeti očuvanju morfološkog i funkcionalnog integriteta jetre, a samim tim i bržem uspostavljanju energetske ravnoteže na početku laktacije, što je veoma značajno kod krava sa genetskom predispozicijom za visoku proizvodnju mlijeka.

**Ključne riječi:** junice, hipotireoza, hormoni, metaboliti

**Naučna oblast:** Morfologija i fiziologija životinja

**Uža naučna oblast:** Fiziologija i metabolizam visokomliječnih krava

**UDK broj:** 612.43:636.234

## **EFFECT OF PREPARTAL PROPYLTHIOURACIL APPLICATION ON ENDOCRINE AND METABOLIC STATUS OF HOLSTEIN HEIFERS**

### **SUMMARY**

The aim of this PhD thesis was to examine the effect of prepartal propylthiouracil (PTU) treatment on endocrine and metabolic status of Holstein heifers in late pregnancy and early lactation. The study was conducted on a total of 30 Holstein heifers, selected in advanced pregnancy. Both groups of heifers were fed a meal adjusted to the nutritive needs for pregnancy and lactation. Experimental group of heifers was orally treated with 4 mg PTU/kg body weight, mixed with 25 ml of maltose syrup, with aim to induce hypothyroidism. Treatment lasted from day 20 before the expected calving date to calving date. Control group of heifers daily received only 25 ml of maltose syrup. Blood samples were taken by jugular vein puncture 20 days before expected calving date, 3 and 7 days later, daily for 5 days before and 5 days after calving, then 7, 15, 30 and 60 days after calving. Liver tissue samples were taken from all heifers by percutaneous biopsy 7 days before expected calving and 7 days after calving. Concentrations of  $T_4$ ,  $T_3$ , insulin and glucose were determined in all blood samples. Based on insulin and glucose concentrations HOMA index value for all sampling periods was calculated. Concentration of IGF-I was determined in blood samples taken on days 20, 17, 13, 7 and 4 before and 7, 30 and 60 days after calving. Relative presence of IGFBP-2, IGFBP-3 and IGFBP-4 were determined in samples taken on days 20 and 7 before and 7 and 30 after calving. Concentrations of BHBA and total bilirubin were determined in blood samples taken on days 20, 17, 13, 7, 4 and 1 before and 1, 3, 5, 7, 15, 30 and 60 after calving. Concentrations of total protein and albumin were determined in blood samples taken on days 20, 17, 13, 7 and 4 before, and 3, 4, 7, 15, 30 and 60 after calving. In the liver tissue samples deiodinase activity, degree of fatty liver and glycogen content were determined. Daily milk production was

monitored from days 7 to 60 of lactation, and the service period is calculated on the basis of the reproductive data records of farm.

During PTU treatment, experimental group of heifers showed a statistically significant decrease in  $T_4$ ,  $T_3$  and BHBA concentration and liver DIO1 activity, as well as a statistically significant increase in serum insulin, IGF-I and glucose concentration, compared to control group of heifers. After cessation of treatment, experimental group heifers there showed a statistically significant and temporary increase of  $T_4$  and  $T_3$  concentration and liver DIO1 activity, compared to the prepartal values, while control group heifers simultaneously showed a declining trend. Concentrations of insulin, IGF-I and glucose in experimental group of heifers remained significantly higher compared to the control group during the postpartum period. Postpartum concentration of BHBA in experimental group of heifers was statistically significantly lower compared to the control group of heifers until 5 days after calving and then significantly higher from day 15 after calving until the end of the study. HOMA index value was higher in experimental group of heifers during the entire study period compared to controls, although statistically significant differences existed only for a period from day 13 before to day 3 after calving. DIO1/DIO3 ratio in experimental group of heifers grew from prepartal the postpartum period ( $0,57 \pm 0,28$  vs.  $3,03 \pm 1,53$ ), while in control group of heifers decrease trend was found ( $1,90 \pm 1,09$  vs.  $1,75 \pm 1,03$ ). In experimental group of heifers relative presence of IGFBP-2 and IGFBP-4 was slightly increased from prepartal to postpartum period, while in control group heifers statistically significant increase in their relative presence was found. The relative percentage of IGFBP-3 in experimental group of heifers increased from prepartal the postpartum period, while in control group of heifers downward trend was established. Concentrations of total protein and albumin found in experimental group of heifers were higher than in control group throughout the study period, although the statistical significance of differences existed only in certain periods of testing. The concentration of total bilirubin in experimental group of heifers was significantly higher compared to controls only during the period from day 13 before calving until the day of calving, while in other periods of testing no statistically significant differences were found. In liver tissue samples taken before parturition neither one of groups had signs of fatty liver, and hepatocyte glycogen content was slightly higher in experimental group of heifers. In liver tissue samples taken after

calving in control group of heifers a moderate degree of fatty liver ( $20,25 \pm 6,51\%$  fat) and reduced glycogen content were found. Mild degree of fatty liver ( $6,70 \pm 4,45\%$  fat) was found in same sampling period in experimental group of heifers, while the glycogen content remained at a high level. The difference in the postpartum degree of fatty liver between the experimental and control group of heifers was statistically significant. Daily milk yield of experimental group of heifers was significantly lower in the period from day 7 to 12 of lactation, and, from day 41 of lactation until the end of the study period, significantly higher than in control group of heifers. Experimental group of heifers had a shorter service period compared to control group of heifers, although statistically significant difference was not found.

Based on these results, it can be concluded that the enhanced activity of thyroid gland in the early postpartum period may contribute to the preservation of the morphological and functional integrity of the liver, and thus reestablishing energy balance in early lactation, which is very important for cows with a genetic predisposition for high milk production.

**Key words:** heifers, hypothyroidism, hormones, metabolites

**Scientific field:** Animal morphology and physiology

**Field of academic expertise:** Physiology and metabolism of dairy cows

**UDK number:** 612.43:636.234

# SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
2.	PREGLED LITERATURE .....	3
2.1.	Karakteristike energetskog metabolizma visokomliječnih krava u peripartalnom periodu.....	3
2.2.	Vrijednosti biohemijskih parametara krvi krava u peripartalnom periodu .....	7
2.3.	Uloga endokrinih mehanizama u regulaciji metabolizma u peripartalnom periodu .	13
2.3.1.	Aktivnost tireoidee u peripartalnom periodu.....	21
2.3.2.	Aktivnost dejodinaza u jetri i perifernim tkivima u peripartalnom periodu.....	28
2.3.3.	Mogućnost upravljanja aktivnošću tireoidee kod goveda .....	33
3.	CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA .....	41
4.	MATERIJAL I METODE RADA .....	42
4.1.	Ogledne životinje .....	42
4.2.	Metode rada.....	45
4.2.1.	Uzimanje uzoraka krvi .....	45
4.2.2.	Uzimanje uzoraka tkiva jetre.....	45
4.2.3.	Određivanje količine proizvedenog mlijeka.....	47
4.2.4.	Određivanje trajanja servis perioda.....	47
4.2.5.	Određivanje koncentracije odabranih biohemijskih parametara krvi.....	47
4.2.6.	Određivanje koncentracije hormona .....	48
4.2.7.	Određivanje relativne zastupljenosti IGF-vezujućih proteina.....	48
4.2.8.	Određivanje ekspresije iRNK za pojedine tipove dejodinaza u tkivu jetre.....	50
4.2.9.	Određivanje stepena zamašćenja jetre i sadržaja glikogena u hepatocitima .....	52
4.2.10.	Statistička obrada podataka .....	53
5.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA .....	54
5.1.	Koncentracija trijodtironina ( $T_3$ ) u krvnom serumu junica.....	54
5.2.	Koncentracija tiroksina ( $T_4$ ) u krvnom serumu junica.....	58
5.3.	Ekspresija iRNK za pojedine tipove dejodinaza u uzorcima tkiva jetre .....	62
5.4.	Koncentracija insulina u krvnom serumu junica.....	67
5.5.	Koncentracija glukoze u krvi junica.....	70
5.6.	Koncentracija BHBA u krvi junica .....	74

5.7.	Vrijednost HOMA indeksa u krvnom serumu junica.....	77
5.8.	Koncentracija IGF-I u krvnom serumu junica .....	81
5.9.	Relativna zastupljenost IGF-vezujućih proteina u krvnom serumu junica .....	84
5.10.	Koncentracija ukupnih proteina u krvnom serumu junica .....	88
5.11.	Koncentracija albumina u krvnom serumu junica.....	91
5.12.	Koncentracija ukupnog bilirubina u krvnom serumu junica .....	94
5.13.	Stepen zamašćenja i sadržaj glikogena u jetri junica .....	98
5.14.	Mliječnost junica i trajanje servis perioda.....	103
6.	DISKUSIJA.....	106
6.1.	Uticaj aplikacije PTU na tireoidni status jedinke.....	107
6.2.	Uticaj aplikacije PTU na koncentraciju insulina, glukoze i BHBA .....	115
6.3.	Uticaj aplikacije PTU na IGF sistem.....	123
6.4.	Uticaj aplikacije PTU na koncentraciju ukupnih proteina i albumina .....	125
6.5.	Uticaj aplikacije PTU na koncentraciju ukupnog bilirubina .....	128
6.6.	Uticaj aplikacije PTU na stepen zamašćenja jetre i sadržaj glikogena u hepatocitima .....	131
6.7.	Uticaj aplikacije PTU na mliječnost i trajanje servis perioda .....	133
7.	ZAKLJUČCI.....	136
8.	LITERATURA.....	138



## Popis korišćenih skraćenica

<b>NEFA</b>	neesterifikovane masne kiseline
<b>BHBA</b>	$\beta$ -hidroksibuterna kiselina
<b>iRNK</b>	informaciona ribonukleinska kiselina
<b>NPY</b>	neuropeptid Y
<b>cAMP</b>	ciklični adenozin-monofosfat
<b>VLDL</b>	lipoproteini veoma male gustine
<b>AST</b>	aspartat-aminotransferaza
<b>ALT</b>	alanin-aminotransferaza
<b>GLDH</b>	glutamat-dehidrogenaza
<b>SDH</b>	sorbitol-dehidrogenaza
<b>GGT</b>	gamaglutamil-transferaza
<b>T4</b>	3,3',5,5'- tetrajodtironin, tiroksin
<b>T3</b>	3,3',5 - trijodtironin, trijodtironin
<b>rT3</b>	3,3',5' - trijodtironin, reverzni trijodtironin
<b>IGF-I</b>	insulinu sličan faktor rasta I
<b>IGFBP 1-6</b>	protein nosač IGF 1-6
<b>DIO 1, 2, 3</b>	dejodinaza tipa I, II, III
<b>MTU</b>	6-metil-2-tiouracil, metiltiouracil
<b>PTU</b>	6-propil-2-metil-tiouracil, propiltiouracil
<b>TMR</b>	kompletni miksirani obrok
<b>PCR</b>	lančana reakcija polimeraze
<b>AU</b>	Arbitrary Unit
<b>TRH</b>	tireotropni releasing hormon
<b>TSH</b>	tireostimulirajući hormon
<b>OTK</b>	ocjena tjelesne kondicije
<b>NEB</b>	negativan bilans energije
<b>HOMA</b>	homeostatic model assessment
<b>PAS</b>	Periodic acid shiff

## 1. UVOD

Proizvodnja mlijeka predstavlja jedan od osnovnih ciljeva savremenog uzgoja goveda. U posljednjih nekoliko decenija došlo je do značajnog povećanja proizvodnje mlijeka, što je rezultat poboljšanja genetskog potencijala krava, te uslova držanja i ishrane. Napretku je svakako doprinio i niz istraživanja sprovedenih sa ciljem upoznavanja fizioloških karakteristika metaboličkih procesa koji se odvijaju u organizmu visokomliječnih krava tokom graviditeta i laktacije. Na taj način je ostvarena mogućnost upravljanja metaboličkim procesima i njihovog korištenja u cilju ispoljavanja genetskog potencijala za proizvodnju mlijeka.

Dugogodišnja selekcija na visoku mliječnost dovodi do sve većih suprotnosti između biološko-fiziološke opterećenosti organizma i zdravlja životinja. Kao rezultat selekcije na proizvodnju mlijeka povećana je učestalost poremećaja zdravlja i reprodukcije, što se negativno odražava na životni i proizvodni vijek grla. U zapažanjima visokomliječnih krava servis period i međutelidbeni interval traju duže, broj teladi po kravi na godišnjem nivou i u toku proizvodnog života je manji, a učestalost pojave poremećaja zdravlja je veća nego u prošlosti. Istraživanja domaćih i stranih istraživača ukazuju na poremećaje metabolizma kao najčešći zdravstveni problem viskomliječnih krava, pri čemu se posebno ističu poremećaji energetskeg metabolizma.

Velike potrebe u energiji i hranljivim materijama za razvoj ploda predstavljaju značajno opterećenje za organizam visokomliječne krave, koje se nakon teljenja dodatno povećava rastućom proizvodnjom mlijeka, koja na našim farmama ide i preko 40 litara dnevno. Visoka proizvodnja mlijeka, zajedno sa nedovoljnim unosom hrane tokom perioda rane laktacije dovodi do iscrpljivanja organizma, te su krave visoke proizvodnje mlijeka podložne kliničkim i subkliničkim poremećajima zdravlja i reprodukcije. Ovi poremećaji su posebno izraženi kod grla sa visokim genetskim potencijalom za proizvodnju mlijeka, koja su u selekcijskom pogledu najinteresantnija.

Poseban značaj u istraživanjima vezanim za fiziologiju i metabolizam visokomliječnih krava pridaje se ispitivanju endokrinog i metaboličkog statusa tokom zasušenja, kao pripremnog perioda za predstojeću laktaciju. Razlog tome je činjenica da promjene u hormonalnom statusu koje se dešavaju tokom ovog perioda predstavljaju mehanizam adaptacije krava na izrazito povećane energetske potrebe koje prate rastuću

proizvodnju mlijeka. To se odnosi na promjenu aktivnosti endokrinog pankreasa i tireoidee, koji učestvuju u regulaciji energetskog metabolizma.

Koncentracija tireoidnih hormona u krvi prije teljenja počinje da opada, kako bi se podržali anabolički procesi koji dominiraju tokom peripartalnog perioda, prvenstveno oni značajni za sintezu sastojaka mlijeka. Istovremeno sa opadanjem koncentracije u sistemskom krvotoku, koncentracija tireoidnih hormona u tkivu mliječne žlijezde se održava unutar fizioloških vrijednosti, zahvaljujući pojačanoj lokalnoj aktivnosti dejodinaza. Ovaj homeoretski mehanizam se smatra dijelom adaptacije energetskog metabolizma na rastuću proizvodnju mlijeka i povećane potrebe u energiji za njegovu sintezu. Ovakav trend kretanja koncentracije tireoidnih hormona je opisan u literaturi i smatra se fiziološkim procesom. Međutim, ukoliko se dalje produbljuje, to smanjenje funkcije tireoidee prestaje da bude faktor adaptacije i postaje faktor rizika koji može dovesti do poremećaja zdravlja visokomliječnih krava.

Pored učešća u regulaciji energetskog metabolizma, tireoidni hormoni podstiču rast i diferencijaciju svih tkiva i organa, djelujući sinergistički sa hormonom rasta i insulinu sličnim faktorom rasta-I (IGF-I). Za organizam visokomliječnih krava od posebne je važnosti njihov uticaj na lokalni rast i diferencijaciju tkiva mliječne žlijezde i reproduktivnih organa, koji tokom završne faze graviditeta i u ranoj laktaciji trpe veliko metaboličko opterećenje. Smatra se da pored direktnog uticaja na rast i diferencijaciju pomenutih tkiva, hormoni tireoidee svoj uticaj ostvaruju i posredno, preko energetskog metabolizma.

Imajući u vidu da su literaturni podaci o uticaju hormona tireoidee na endokrini i metabolički status visokomliječnih krava tokom peripartalnog perioda u uslovima indukovane hipotireoze oskudni, smatrali smo da postoji naučna opravdanost za sprovođenjem takvog istraživanja. Na taj način bi se doprinijelo boljem poznavanju uloge hormona tireoidee u regulaciji energetskog metabolizma u peripartalnom periodu, kao i njihovoj interakciji sa drugim mehanizmima koji regulišu metabolička i endokrina prilagođavanja na procese intenzivne laktacije.

## **2. PREGLED LITERATURE**

### **2.1. Karakteristike energetskeg metabolizma visokomliječnih krava u peripartalnom periodu**

Tranzicioni ili peripartalni period obuhvata vrijeme od tri nedelje prije do tri nedelje nakon teljenja i smatra se najosjetljivijim i najkritičnijim periodom u proizvodno-reproduktivnom ciklusu visokomliječnih krava (Grummer, 1995; Filipović i sar., 2007). U ovom periodu dolazi do aktivacije homeoetskih mehanizama regulacije metaboličkih procesa u organizmu, sa ciljem podrške razvoju ploda, odnosno proizvodnji mlijeka.

Bauman i Currie (1980) su definisali koncept homeoreze kao princip regulacije metaboličkih procesa tokom graviditeta i laktacije, označavajući ga kao "orkestrirane i koordinisane promjene u metabolizmu tkiva i cijelog organizma, neophodne da se podrži fiziološko stanje". Drugim riječima, homeoreza predstavlja prilagođavanje svih tkiva na novonastalo fiziološko stanje, gdje se njihovo funkcionisanje podređuje očuvanju tog stanja i maksimalnoj funkciji organa ključnog za dato stanje (materica ili mliječna žlijezda).

Tokom perioda kasne laktacije, a naročito tokom perioda zasušenja, krave unose veću količinu energije nego što je potrebno za zadovoljenje uzdržnih i potreba gravidnog uterusa, te se višak energije deponuje u vidu masnog tkiva. Metabolizam ugljenih hidrata i masti u visokom graviditetu karakterišu pojačana glukoneogeneza u jetri i smanjenje periferne utilizacije glukoze; nepromijenjena ili smanjena utilizacija acetata; umjerena mobilizacija slobodnih masnih kiselina iz masnog tkiva praćena povećanjem njihove utilizacije u perifernim tkivima. Ovakvim prestrojavanjem metaboličkih procesa treba da se obezbijede dovoljne količine glukoze i aminokiselina za rast ploda, dok je organizam majke usmjeren na potrošnju slobodnih masnih kiselina i ketonskih tijela kao izvora energije. Postpartalno dolazi do inverzije nivoa glukoze i slobodnih masnih kiselina, što ukazuje na veliku potrošnju glukoze u mliječnoj žlijezdi, dok se sistemski metabolizam usmjerava u pravcu korišćenja lipida kao izvora energije, sa ciljem da se u metaboličkom smislu podrži laktacija (Bauman i Currie, 1980; Bell i Bauman, 1997).

Kao posljedica rastućih potreba u energiji i smanjenog unosa energije hranom zbog pada apetita i smanjene resorptivne sposobnosti buraga u ranom postpartalnom periodu homeoretski mehanizmi nadvladavaju homeostatske i proizvodnja mlijeka se značajnim dijelom održava na račun tjelesnih rezervi životinje, pri čemu često i lako dolazi do poremećaja zdravlja (Šamanc i sar., 2005b).

Negativan energetska bilans ima za posljedicu intenziviranje lipomobilizacije, kao vid homeostatskog odgovora organizma. Mobilizacija masnih kiselina i povišenje njihove koncentracije u krvi nastaju zbog pojačane lipolize u masnom tkivu i nedovoljne reesterifikacije oslobođenih slobodnih masnih kiselina u jetri. Već tokom visokog graviditeta dolazi do smanjenja intenziteta lipogeneze i esterifikacije slobodnih masnih kiselina, da bi se taj proces sa početkom laktacije dalje intenzivirao (McNamara i Hillers, 1986). Kovačević i saradnici (2005) su ustanovili da je koncentracija neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA) u krvi krava statistički značajno niža u visokom graviditetu nego u periodu rane laktacije. Pri tome je ustanovljeno da je njihova koncentracija kod ugojenih krava viša u odnosu na krave optimalne tjelesne kondicije, što potvrđuju i rezultati do kojih su došli Busato i saradnici (2002) i Stengärde i saradnici (2008).

Deficit glikogenoplastičnih jedinjenja i energetskih prekursora koji nastaje zbog nedovoljnog unosa hrane onemogućava potpuno iskorištavanje mobilisanih masti, te kao posljedica toga dolazi do nakupljanja acetil- ostataka i intenziviranja ketogeneze (Šamanc i sar., 2005b). Intenzivna lipomobilizacija ima za posljedicu povećanje koncentracije NEFA u krvi, što produbljuje postojeći negativan bilans energije, jer preko inhibicije centra za glad dodatno smanjuje unos hrane (Ingvarsen i Andersen, 2000).

Tokom perioda laktacije mliječna žlijezda svoje potrebe u glukozu bazira na glukoneogenezi u jetri i smanjenju periferne utilizacije glukoze. Za potrebe mliječne žlijezde iskoristiva je samo glukoza stvorena putem glukoneogeneze u jetri, jer ona jedino iz krvi može da bude preuzeta od strane mliječne žlijezde. Deficit glukoze treba da se popravi endogenom mobilizacijom glukoze, glukoneogenetskih jedinjenja iz raspoloživih rezervi, za šta je presudna adaptacija endokrinog sistema (Beale i sar., 1984). Zbog toga dolazi do trošenja rezervi glikogena iz jetre, snižavanja glikemije i

povećanja koncentracije slobodnih masnih kiselina i ketonskih tijela (Šamanc i sar., 2005a).

Sa povećanjem potreba u energiji na početku laktacije u organizmu se intenziviraju i katabolički i anabolički procesi. U mliječnoj žlijezdi dominiraju anabolički, u masnom tkivu katabolički, dok se u jetri istovremeno odvijaju i anabolički (glukoneogeneza, sinteza triglicerida i lipoproteina) i katabolički procesi ( $\beta$ -oksidacija masnih kiselina) (Šamanc i sar., 2005b).

Energetska efikasnost organizma visokomliječne krave tokom perioda rane laktacije, odnosno iskoristivost energije dostupne iz obroka i tjelesnih rezervi zavisi od količine unijete suve materije hrane, količine energije izlučene putem fecesa, urina i tjelesne toplote (Jorritsma i sar., 2003), stepena adaptacije mikroflore buraga (Grummer, 1995) i resorptivne površine resica buraga (Dirksen i sar., 1999).

Prilagođavanje metabolizma visokomliječnih krava na procese intenzivne laktacije obuhvata pojačan unos hrane i vode, povećanje kapaciteta digestivnih organa zajedno sa povećanjem njihove sposobnosti za resorpciju hranljivih materija i intenziviranju lipolize (Park i Lindberg, 2004; Filipović i sar., 2007). Proces adaptacije organizma na nastali negativni bilans energije traje približno do 72. dana laktacije (Garnsworthy i Jones, 1987; Drackley, 1999; Heuer i sar., 2000). U to vrijeme ponovo se uspostavlja narušena ravnoteža između unosa energije hranom i energetske potreba životinja. Jorritsma i saradnici (2003) navode da je negativan bilans energije u najvećem stepenu izražen do dvanaestog dana nakon teljenja, dok se energetska ravnoteža između potreba i unosa energije putem hrane postiže približno 72. dana laktacije (Canfield i Butler, 1990; DeVries i sar., 1999).

Količina deponovanog masnog tkiva, odnosno tjelesna kondicija u vrijeme teljenja i na početku laktacije je važan faktor za iskorištavanje tjelesnih rezervi energije tokom peripartalnog perioda. Krave koje u laktaciju ulaze ugojene više gube na tjelesnoj kondiciji i sporije povećavaju količinu unijete suve materije, te maksimum postižu značajno kasnije od uobičajenih 12 do 16 nedelja laktacije (Garnsworthy i Topps, 1982; Kunz i sar., 1985; Garnsworthy i Jones, 1987; De Vries i sar., 1999). Ovi autori navode da restrikcija obroka tokom perioda zasušenja, sa ciljem postizanja optimalne tjelesne kondicije, ima za rezultat brži porast unosa suve materije hrane tokom rane laktacije, kao i manji gubitak tjelesne kondicije.

Metabolička ravnoteža kod goveda najpodložnija je narušavanju u ranoj fazi laktacije, kada se sa povećanjem proizvodnje mlijeka povećavaju i potrebe u energiji. Od ukupne količine sintetisane glukoze kod krava u peripartalnom periodu, svega se deseti dio koristi za potrebe sistemskog energetskeg metabolizma, dok se sve ostalo koristi za potrebe fetusa, odnosno sintezu laktoze (Šamanc i sar., 2005b). Nedovoljna glukoneogeneza u jetri iz propionata, glukoneoplastičnih aminokiselina, glicerola i laktata, i pored smanjenja periferne utilizacije glukoze, ne zadovoljava rastuće potrebe mliječne žlijezde za glukozom (Bauman i Elliot, 1983; Hough i sar., 1985). Deficit glukoze u krvi i nedostatak glikogenoplastičnih materija u hrani potenciraju korišćenje aminokiselina iz tjelesnih proteina, kao krajnje energetske rezerve organizma. Zbog gubitka proteina iz skeletnih mišića, dijametar njihovih vlakana se smanjuje i do 25% (Reid i sar., 1980). Boisclair i saradnici (1993) smatraju da smanjenje dijametra mišićnih vlakana nije posljedica razlaganja već postojećih proteina, već supresije njihove sinteze i usmjeravanja aminokiselina u energetskeg metabolizam.

Kod krava sa nižom mliječnosti postoji mogućnost da se aktivnost mliječne žlijezde uskladi sa kapacitetom jetre za glukoneogenezu i na taj način glikemija održi unutar fizioloških granica. Kod krava koje proizvode veće količine mlijeka, ove mogućnosti su znatno manje, jer potrebe mliječne žlijezde često prevazilaze ukupni obim glukoneogeneze. Stamatović i saradnici (1983) su ustanovili da su varijacije glikemije najveće nakon teljenja, a glavnim uzrokom tih varijacija smatraju aktivnost mliječne žlijezde. Ovi autori su ispitivali glikemiju kod krava u zasušenju, neposredno pred teljenje, nakon teljenja, u prvom i drugom mjesecu laktacije. Krv je paralelno uzimana iz *v. auricularis magna* i *v. subcutanea abdominis*. Vrijednosti glikemije prije porođaja nisu se razlikovale, dok su 7. dana nakon teljenja ustanovljene statistički veoma značajne razlike u vrijednostima glikemije. Ove razlike su ustanovljene kod svih grla, bez obzira na visinu mliječnosti. Uzorci uzeti u drugom mjesecu laktacije ukazivali su da je kod krava visoke mliječnosti (30 litara mlijeka dnevno) statistički visoko značajna razlika u koncentracijama glukoze u uzorcima krvi iz ove dvije vene postojala i dalje, dok kod krava niže dnevne mliječnosti (15 litara) nisu ustanovljene statistički značajne razlike. Ovi podaci govore u prilog tvrdnji da je aktivnost homeoretskih mehanizama kod krava visoke mliječnosti izraženija u odnosu na krave koje dnevno daju manju količinu mlijeka.

Jorritsma i saradnici (2003) navode da se tokom perioda rane laktacije kao izvor energije djelimično koriste i tkivni proteini, što ima za posljedicu porast koncentracije uree u krvi. Koncentracija uree u krvi se kod krava neadekvatno pripremljenih za laktaciju povećava i zbog nedovoljne prilagođenosti mikroflore buraga na sastav obroka. Dodatni faktor koji utiče na koncentraciju uree u krvi, pored povećane količine amonijaka koji u jetru dospijeva iz buraga, je i postojanje većeg ili manjeg stepena zamašćenja jetre, koje ograničava kapacitet jetre za detoksikaciju amonijaka i njegovo pretvaranje u ureu (Zhu i sar., 2000).

Imajući na umu da se proizvodnja mlijeka uz pomoć homeoretskih mehanizama održava na približno istom nivou, bez obzira na količinu konzumirane hrane, pojedini autori (Villa-Godoy i sar., 1988; Andrews i sar., 1991; Zurek i sar., 1995; Drackley, 1999) smatraju da stepen negativnog bilansa energije više zavisi od količine suve materije hrane koju životinje unesu, nego od rastućih energetske potrebe za proizvodnju mlijeka. Imajući u vidu da lipomobilizacija kod krava koje prepartalno imaju smanjen apetit otpočinje ranije i da je intenzivnija u odnosu na krave kod kojih je pad apetita manje izražen, može se zaključiti da je unos hrane u visokom graviditetu i ranom postpartalnom periodu faktor od kojeg zavisi sposobnost životinja da se prilagode uslovima negativnog bilansa energije.

Rezultati do kojih je došao Kovačević (2004) ukazuju na povezanost visoke mliječnosti sa dužinom trajanja postpartalnog negativnog energetskeg bilansa. Kod krava sa višom mliječnošću, prema ovom autoru, negativan bilans energije traje duže, a koncentracija tireoidnih hormona je niža i do dva mjeseca nakon teljenja, u odnosu na krave niže mliječnosti. Na osnovu toga, on zaključuje da su krave sa nižom mliječnošću do 60. dana laktacije uspjele da uspostave energetske ravnatežu i stabilizuju hormonsku regulaciju metaboličkih procesa. Krave sa višom mliječnošću se i krajem drugog mjeseca laktacije nalaze u stanju negativnog bilansa energije, a na to ukazuju i niske koncentracije tireoidnih hormona i insulina.

## **2.2. Vrijednosti biohemijskih parametara krvi krava u peripartalnom periodu**

Vrijednosti biohemijskih parametara krvi i njihove promjene, do kojih dolazi tokom peripartalnog perioda, predstavljaju važan indikator metaboličkog statusa i zdravstvenog stanja visokomliječnih krava. Većina autora smatra da je za adekvatnu



procjenu metaboličkog statusa životinja neophodno odrediti vrijednosti biohemijskih parametara koji ukazuju na energetske status (koncentracije glukoze, BHBA, uree, triglicerida i holesterola), funkcionalno stanje jetre (aktivnost jetrinih enzima, koncentracija albumina, globulina, ukupnih proteina i bilirubina) i mineralni status (koncentracija i odnos kalcijuma i fosfora) (Brugere-Picoux i Brugere, 1987; Lotthammer, 1991; Cebra i sar., 1997; Stojević i sar., 2002; Ivanov i sar., 2005; Stojević i sar., 2005; Savić i sar., 2010).

Glikemija se kod zdravih krava tokom prepartalnog perioda održava unutar fizioloških granica (2,2-4,16 mmol/l) (Ivanov i sar., 2005; Kaneko i sar., 2008), što predstavlja indikator pozitivnog bilansa energije i nesmetanog odvijanja procesa glukoneogeneze. Snižena prepartalna koncentracija glukoze ukazuje na poremećaj energetskog bilansa i najčešće se pojavljuje istovremeno sa povišenjem koncentracije NEFA i BHBA (Coulon i sar., 1985; Vazquez-Añon i sar., 1994; Itoh i sar., 1998; Bernabucci i sar., 2005; Janovick i sar., 2011). Na sam dan teljenja ustanovljen je nagli porast koncentracije glukoze u krvi, najvjerojatnije kao rezultat stresa i djelovanja hormona koji podstiču glukoneogenezu i glikogenolizu, kao što su glukagon i adrenalin. Tokom rane laktacije koncentracija glukoze naglo opada u odnosu na prepartalne vrijednosti, kao rezultat povećanih potreba u energiji i pojačanog preuzimanja u mliječnoj žlijezdi za sintezu laktoze (Bauman i Currie, 1980; Bell, 1995). Kao posljedica povećanih potreba u energiji prvo dolazi do pražnjenja depoa glikogena iz jetre, a potom do mobilizacije masnih kiselina iz tjelesnih depoa, što kod krava u ranoj laktaciji redovno dovodi do zamašćenja jetre različitog stepena, koje se negativno odražava na glukoneogenu i uopšte sintetsku sposobnost hepatocita (Vazquez-Añon i sar., 1994). Na jaku negativnu korelaciju količine triglicerida u tkivu jetre, odnosno stepena zamašćenja i koncentracije glukoze u krvi ukazuju i rezultati do kojih su došli Bertics i saradnici (1992). Stabilnost i visina glikemije su u bliskoj vezi sa dnevnom količinom proizvedenog mlijeka, jer je ustanovljeno da se kod krava sa višom mliječnosti niske vrijednosti glikemije održavaju duže u odnosu na krave niže mliječnosti, na šta ukazuju i rezultati do kojih su došli Stamatović i saradnici (1983) i Kovačević (2004).

Tokom perioda rane laktacije, kada su potrebe organizma u energiji povećane, a koncentracija glukoze niska, remeti se ravnoteža između upotrebe oksal-acetata u

procesima beta-oksidacije masnih kiselina i procesima glukoneogeneze (Janovick i sar., 2011). Kao rezultat poremećaja te ravnoteže, mobilisane masne kiseline se nepotpuno oksidišu u mitohondrijama hepatocita i nastaje veća količina acetil-ostataka, koji se pretvaraju u ketonska tijela. Koncentracija BHBA u krvi krava tokom peripartalnog perioda se nalazi u negativnoj korelaciji sa koncentracijom glukoze, a u pozitivnoj sa koncentracijom NEFA (Coulon i sar., 1985; Miettinen, 1990; Itoh i sar., 1998). Njeno povišenje, zajedno sa sniženom koncentracijom glukoze, predstavlja indikator negativnog bilansa energije i pojačane ketogeneze u jetri. Povišenje koncentracije BHBA je redovna pojava tokom perioda rane laktacije i ukazuje na opterećenje hepatocita mobilisanim masnim kiselinama iz tjelesnih depoa, nastalo kao posljedica povećanih potreba u energiji (Ospina i sar., 2010a). Iako se povišenje koncentracije ketonskih tijela pojavljuje kod svih mliječnih krava na početku laktacije, kritičnom granicom se smatraju koncentracije BHBA od 0,7 mmol/l nedelju dana prije teljenja, odnosno 1,2 mmol/l tokom prve dvije nedelje nakon teljenja (LeBlanc, 2010; Chapinal i sar., 2012; Roberts i sar., 2012).

Razlaganjem proteina u buragu pod dejstvom mikroorganizma oslobađa se amonijak, koji prisutni mikroorganizmi jednim dijelom koriste za sintezu sopstvenih proteina. Ostatak amonijaka se resorbuje preko sluzokože buraga i putem krvi dopijeva u jetru, u kojoj se od njega sintetiše urea (Tennant i Center, 2008). Ugradnja amonijaka u proteine mikroorganizama uslovljena je dostupnošću energije iz obroka, te u uslovima nedovoljnog unosa hrane dolazi do pojačanog prelaska amonijaka u krvotok i pojačane ureageneze u jetri (Stojević i sar., 2002). U tom smislu, koncentracija uree u krvi visokomliječnih krava predstavlja indikator snabdjevenosti energijom i proteinima, a njene fiziološke vrijednosti se prema navodima različitih autora kreću u rasponu od 1,66 do 6,66 mmol/l. (Jazbec, 1990; Stamatović i sar., 1990; Lotthammer, 1991; Kaneko i sar., 2008). Do povišenja koncentracije uree dolazi u slučaju apsolutnog ili relativnog suficita proteina u obroku, sa apsolutnim ili relativnim deficitom energije, a do smanjenja u slučajevima deficita proteina u obroku ili kombinovanog deficita energije i proteina zbog smanjenog unosa hrane, što je posebno izraženo tokom perioda rane laktacije (Ivanov i sar., 2005; Quiroz-Rocha i sar., 2009). Nakupljanje triglicerida u tkivu jetre, koje u većem ili manjem stepenu postoji kod većine krava u periodu rane laktacije, ograničava ureagenu i detoksikacionu sposobnost jetre (Strang i sar., 1998;

González i sar., 2011), što može imati za posljedicu nakupljanje amonijaka u krvi i razvoj hepatičke encefalopatije i drugih poremećaja zdravlja. U prilog tome govore i istraživanja u kojima je kod krava uginulih od hepatične jetrine kome utvrđen visok stepen zamašćenja jetre (Gregorović i sar., 1962; Šamanc i sar., 1996; Šamanc, 2009).

Koncentracija triglicerida u krvi krava tokom peripartalnog perioda predstavlja odraz energetskog bilansa, a, s obzirom da se najveći dio triglicerida krvi sintetiše u jetri, istovremeno i njenog funkcionalnog stanja. Kao referentnu vrijednost koncentracije triglicerida u krvi krava Stamatović i saradnici (1990) i Šamanc (2009) navode raspon od 0,10-0,30 mmol/l. Tokom prepartalnog perioda koncentracija triglicerida je u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom NEFA, što ukazuje na stabilnost energetskog bilansa i sposobnost hepatocita da mobilisane masne kiseline ugrade u sastav triglicerida. Nakon teljenja dolazi do suprotnog trenda kretanja koncentracija ova dva biohemijska parametra, jer koncentracija triglicerida opada, a koncentracija NEFA raste (Van den Top i sar., 1995; Rukkwamsuk i sar., 1999). Ovakav trend kretanja je rezultat intenzivne lipomobilizacije i ograničene sposobnosti hepatocita da esterifikuju pristigle masne kiseline i u sastavu VLDL ih transportuju do perifernih tkiva u kojima će se iskoristiti kao izvor energije (Grummer, 1993; Bernabucci i sar., 2004; van den Top i sar., 2005). Schwalm i Schultz (1976) navode da je opadanje koncentracije triglicerida u krvi posebno izraženo kod ketoznih i krava sa jakim zamašćenjem jetre, što potvrđuju i rezultati drugih autora (Van den Top i sar., 1995; Đoković, 1998).

Sinteza holesterola odvija se iz acetil-koenzima A pod dejstvom enzima hidrosimetilglutaril-koenzim A reduktaze, najvećim dijelom u jetri, u značajno manjoj mjeri u kori nadbubrežne žlijezde i polnim žlijezdama (Beitz, 2004). Aktivnost ovog enzima podstiče insulin, a inhibiraju je glukagon i glukokortikosteroidi (Vernon, 2005). Dominacija kataboličkih hormona tokom ranog postpartalnog perioda dovodi do opadanja koncentracije holesterola u odnosu na prepartalne vrijednosti (Bobe i sar., 2003), koje je potencirano zamašćenjem jetre (Herdt i sar., 1983; Oikawa i Katoh, 2002). Opadanju koncentracije holesterola u krvi visokomliječnih krava, kao i u slučaju triglicerida, doprinosi i ograničena sposobnost hepatocita za sintezu lipoproteina veoma male gustine (VLDL) (Rayssiguier i sar., 1988; Mazur i sar., 1992), pomoću kojih se značajan dio holesterola odnosi iz jetre.

Aktivnost enzima jetre se povećava kao indikator narušavanja njenog morfološkog i funkcionalnog integriteta. Većina autora (Lotthammer, 1991; Forenbacher, 1993; Hoffman i Solter, 2008; Šamanc, 2009) kao pouzdane indikatore funkcionalnog stanja jetre navodi aktivnosti aspartat-aminotransferaze (AST), alanin-aminotransferaze (ALT), sorbitoldehidrogenaze (SDH), gamaglutamiltransferaze (GGT) i glutamat-dehidrogenaze (GLDH). Tokom peripartalnog perioda najčešći uzrok povišene aktivnosti enzima jetre su oštećenje hepatocita usljed nakupljanja triglicerida i ketozna stanja (Steen i sar., 1997; Cebra i sar., 1997; Steen, 2001; Stojević i sar., 2002; Bugarski, 2002; Stojević i sar., 2005). Povišenje koncentracije enzima primarno lociranih u citoplazmi hepatocita, kao što je AST, ukazuje na blago oštećenje hepatocita, i smatra se validnim parametrom za procjenu funkcionalnog stanja jetre samo ako je istovremeno ustanovljen i porast koncentracije bilirubina. Povišena aktivnost GLDH iznad 10 IJ je specifična za promjene na hepatocitima goveda i smatra se validnim parametrom za procjenu stepena oštećenja jetre (Šamanc, 2009).

Prema navodima većine autora, fiziološka koncentracija ukupnih proteina u krvi krava iznosi 60-80 g/l (Stamatović i sar., 1990), od čega albumini čine 35-50% (Kaneko i sar., 2008). Koncentracija albumina je indikator snabdjevenosti azotom i funkcionalnog stanja jetre (Roil i sar., 1974; Piccione i sar., 2011). Hiperalbuminemija se pojavljuje najčešće u vezi sa dehidracijom, hipomagnezijemijom i hemokonzentracijom, a hipoalbuminemija u vezi sa narušavanjem morfološkog i funkcionalnog integriteta jetre, bolestima bubrega i hroničnim parazitozama. Do opadanja koncentracije ukupnih proteina dolazi u slučajevima anemije, pothranjenosti i poremećaja funkcionalnog stanja jetre, a do povišenja u slučajevima dehidracije i hroničnih zapaljenskih procesa (Ivanov i sar., 2005). Tokom peripartalnog perioda kod zdravih krava ne dolazi do značajnijih promjena koncentracije ukupnih proteina, na šta ukazuju rezultati više autora (Pestevšek i sar., 1980; Jovanović i sar., 1987; Kudlác i sar., 1995; Kovačević, 2004). Koncentracija ukupnih proteina tokom uskog perioda oko samog teljenja (nekoliko dana prije, odnosno poslije) blago opada kao rezultat ulaska dijela globulina krvi u sastav kolostruma, što potvrđuju podaci do kojih su došli Pestevšek i saradnici (1980). Nasuprot ovoj tvrdnji, Kovačević (2004) je tokom ranog puerperijuma ustanovio višu koncentraciju ukupnih proteina u odnosu na vrijednosti ustanovljene u visokom graviditetu i drugom mjesecu laktacije, koju tumači

hemokoncentracijom. Kod krava kod kojih je negativan energetska bilans jako izražen i dugo traje, dolazi do opadanja koncentracije ukupnih proteina i albumina, kao rezultat pojačanog iskorištavanja aminokiselina u procesima glukoneogeneze i ograničene sintetske sposobnosti hepatocita usljed zamašćenja (Šamanc, 2009), što je posebno izraženo kod ketoznih krava (Bugarski, 2002) i krava visoke proizvodnje mlijeka (Kovačević, 2004).

Birubinemija se smatra jednim od najpouzdanijih biohemijskih parametara u procjeni funkcionalnog stanja jetre (Rosenberger, 1979; Lotthammer, 1991; Forenbacher, 1993; Šamanc, 2009). U literaturi su dostupni različiti podaci o fiziološkim vrijednostima bilirubinemije, sa donjom granicom od 0,17  $\mu\text{mol/l}$  (Vrzgula i Sokol, 1987; Kaneko i sar., 2008) do 1,20 (Forenbacher, 1993), i gornjom od 5,10 (Forenbacher, 1993) do 8,55  $\mu\text{mol/l}$  (Kaneko i sar., 2008). S obzirom na značajna variranja koncentracije bilirubina tokom različitih faza proizvodno-reproduktivnog ciklusa krava, Lotthammer (1991) kao fiziološke vrijednosti tokom prve dvije nedelje laktacije označava sve one niže od 7,70  $\mu\text{mol/l}$ . Povišenje koncentracije bilirubina nastaje kao posljedica masovne hemolize, kada dolazi do povišenja koncentracije i konjugovanog i nekonjugovanog bilirubina, ili kao posljedica oštećenja jetre, kada uglavnom dolazi do povišenja koncentracije konjugovanog bilirubina (Šamanc, 2009). Tokom postpartalnog perioda dolazi do značajnog povišenja koncentracije bilirubina u odnosu na prepartalni period, a kao glavni razlog se navodi oštećenje jetre usljed procesa zamašćenja (Horvat i Jovanović, 1999).

Koncentracije i međusobni odnos kalcijuma i fosfora u krvi smatraju se osnovnim indikatorima mineralnog statusa krava (Ivanov i sar., 2005). Kao fiziološka vrijednost za koncentraciju kalcijuma navodi se raspon od 2,00 do 3,10 mmol/L (Jazbec, 1990; Kaneko i sar., 2008; Quiroz-Rocha i sar., 2009), a za koncentraciju fosfora raspon od 1,6 do 2,3 mmol/L (Ivanov, 1988; Lotthammer, 1991; Kaneko i sar., 2008). Tokom završne faze graviditeta i peripartalnog perioda dolazi do značajnih promjena koncentracije kalcijuma i fosfora kao posljedica mineralizacije tkiva fetusa, preuzimanja značajnih količina ovih minerala u mliječnoj žlijezdi i njihove sekrecije putem mlijeka (Ivanov, 1988). Opadanje njihove koncentracije posebno je izraženo u periodu od nekoliko dana prije do nekoliko dana nakon teljenja, da bi se potom stabilizovalo kao rezultat jake homeostatske kontrole održavanja njihovih fizioloških koncentracija u krvi

(Radojičić, 1995). Homeostatska kontrola održavanja fosfatemije je nešto slabija u odnosu na održavanje kalcemije, kao posljedica učešća fosfora u procesima energetskog metabolizma, zbog čega je hipofosfatemija čest nalaz tokom peripartalnog perioda, ali i kasnije tokom laktacije (Gregorović i sar., 1986).

### **2.3. Uloga endokrinih mehanizama u regulaciji metabolizma u peripartalnom periodu**

U osnovi homeostatskih i homeoretskih mehanizama koji regulišu metabolizam organskih i neorganskih materija tokom peripartalnog perioda nalaze se endokrini mehanizmi. Regulacija metaboličkih procesa u peripartalnom periodu je veoma složena, zbog odnosa pojedinih hormona i povezanosti ishrane sa funkcijom pojedinih endokrinih žlijezda. Međusobni odnosi hormona i ishrane koji će usloviti odlike metabolizma krava u peripartalnom periodu uspostavljaju se znatno ranije, i zato je poremećaje ove vrste teško korigovati (Sutton i sar., 1980; Šamanc i sar., 1993; Jorritsma, 2003; Huszenica i sar., 2004; Šamanc i sar., 2005c).

Hormonalna konstelacija koja postoji u peripartalnom periodu, zajedno sa gubitkom apetita i povećanim potrebama u energiji za produkciju mlijeka, determiniše lipomobilizaciju kao glavni metabolički put. Kontrola brzine mobilizacije i intenziteta korišćenja tjelesnih rezervi je od presudnog značaja za očuvanje morfološkog i funkcionalnog integriteta jetre, organa koji u uslovima negativnog bilansa energije trpi ogromno metaboličko opterećenje.

Mnogobrojni autori (Morrow, 1976; Kapp i sar., 1979; Đurđević i sar., 1980, 1985; Šamanc i sar., 1991; Vasquez-Anon i sar., 1991; Bertics i sar., 1992; Grummer i sar., 1993; Đoković i sar., 2007) povezuju poremećaje neurohormonalne ravnoteže sa etiopatogenezom peripartalnih poremećaja zdravlja visokomliječnih krava. Prema njihovom mišljenju, usljed kontinuiranog povećanja metaboličkog opterećenja tokom peripartalnog perioda, endokrini mehanizmi nisu više u stanju da održe ravnotežu između intenziteta metaboličkih procesa i nastalih potreba u energiji, što često može da evoluiru u patološko stanje. Pojedini autori (Kapp i sar., 1979; Chillard, 1990; Gaal, 1993; Šamanc i sar., 1993) ističu da nedovoljna i neadekvatna adaptacija endokrinog sistema u periodu oko teljenja predstavlja jedan od osnovnih etioloških faktora narušavanja metaboličke ravnoteže i nastanka poremećaja zdravlja.

Stepen aktivnosti pojedinih endokrinih žlijezda utiče na ravnotežu između homeostatskih i homeoretskih mehanizama, usmjeravajući na taj način tok i promet hranljivih materija u pravcu prioriternih metaboličkih procesa (Šamanc i sar., 2005c). Porođaj i početak laktacije predstavljaju okidač kojim se endokrini sistem preusmjerava od jednog ka drugom homeoretski prioritetnom procesu. Pod uticajem izmijenjenog odnosa hormona dolazi do izmjene aktivnosti skoro svih ćelija organizma, sa ciljem da se metabolički favorizuje rad mliječne žlijezde (Bauman i Currie, 1980).

Metabolički procesi u hepatocitima se nalaze pod kontrolom endokrinih mehanizama, među kojima se na jednom od prvih mjesta nalazi sistem insulin-glukagon. Ostali hormoni koji učestvuju u regulaciji lipomobilizacije i iskorištavanja masti u hepatocitima su somatotropni hormon, IGF-I, leptin i hormoni tireoidee. U ovom pogledu poseban značaj imaju hormoni tireoidee.

Insulin snižava glikemiju i omogućava ulazak glukoze u ćelije i njeno korištenje za energetske potrebe. U jetri i masnom tkivu on djeluje anabolički, podstičući lipogenezu, snižavajući na taj način koncentraciju slobodnih masnih kiselina u krvi. Takođe, on inhibira procese glukoneogeneze, djelujući na taj način suprotno glukagonu (Aschenbach i sar., 2010). Pri tome je važno naglasiti da, s obzirom na fiziološki nisku glikemiju, tkiva preživara pokazuju manju osjetljivost na dejstvo insulina u odnosu na nepreživare (Bell, 1995).

U peripartalnom periodu dolazi do snižavanja bazalnog nivoa insulina, pri čemu nema značajnijih promjena nivoa glukagona (Holtenius, 1993). Koncentracija insulina tokom perioda zasušenja je visoka, da bi između desetog i petog dana pred teljenje počela da opada. Između petog dana prije teljenja i samog teljenja insulinemija je podložna velikim varijacijama, da bi nakon teljenja ostala niska (Radcliff i sar., 2003), iako prema desetom danu nakon teljenja pokazuje tendenciju rasta. Isti autori su ustanovili da glikemija prati nivo insulina i nalazi se u korelaciji sa njim. Hipoinsulinemija koja se pojavljuje tokom visokog graviditeta i rane laktacije ima za posljedicu intenziviranje lipolize i često nekontrolisanu lipomobilizaciju. Insulinemija i koncentracija slobodnih masnih kiselina u krvi se nalaze u negativnoj korelaciji, te se u uslovima hipoinsulinemije u peripartalnom periodu nivo slobodnih masnih kiselina naglo povećava, što je posebno izraženo u prvim danima laktacije (Šamanc i sar., 2005c). U peripartalnom periodu postoji rezistencija perifernih tkiva na insulin, što

smanjuje perifernu utilizaciju glukoze (Leturque i sar., 1987; Petterson i sar., 1993, 1994). Smanjenje osjetljivosti perifernih tkiva prema insulinu (i glukozi) pri niskoj insulinemiji dovodi do skoro potpunog prestanka lipogeneze u masnom tkivu, što je ustanovljeno kod ovaca (Vernon i sar., 1981) i goveda (McNamara i Hillers, 1986).

Rezistencija masnog i mišićnog tkiva prema insulinu (Faulkner i sar., 1990; Vernon i sar., 1990) koja postoji u umjerenom stepenu u periodu rane laktacije (2-4 nedelje nakon teljenja) dovodi do intenziviranja utilizacije masti i aminokiselina za sistemske energetske potrebe, i na taj način štedi glukozu potrebnu za sintezu laktoze u mliječnoj žlijezdi. Bonczek i saradnici (1988) navode da krave više mliječnosti sve do sredine laktacije imaju niže koncentracije insulina u krvi, što tumače njihovom slabijom sposobnošću adaptacije na metaboličko opterećenje u ranoj laktaciji i stanje negativnog bilansa energije. Van den Top i saradnici (1995) ističu da krave kod kojih je negativan bilans energije jako izražen, i kod kojih postoji nakupljanje triglicerida u tkivu jetre, imaju statistički značajno niže koncentracije insulina u krvi.

Dejstvo glukagona je antagonističko insulinu. On podstiče lipolizu i ketogenezu, glukoneogenezu i glikogenolizu, čime dovodi do povećanja glikemije i koncentracije slobodnih masnih kiselina u krvi. Posebnu važnost ovaj efekat glukagona ima za preživare, zbog fiziološki niske glikemije i stalne potrebe za glukoneogenezom iz neugljenohidratnih jedinjenja, posebno izražene tokom laktacije zbog povećane potrošnje glukoze za sintezu laktoze (Williams i sar., 2006). Basset (1971) i Baird (1982) navode da lipolitičko i ketogeno dejstvo glukagona ne mora obavezno da se kao takvo ispolji kod preživara. Pojačano preuzimanje glukoze u mliječnoj žlijezdi, koje postoji tokom rane laktacije, dovodi do pada koncentracije insulina i porasta koncentracije glukagona, što potencira procese lipolize i beta-oksidacije masnih kiselina (Vernon, 2005). Hippen i saradnici (1999) su kod krava, u postupku indukcije zamašćenja jetre davanjem glukagona u peripartalnom periodu ustanovili podizanje glikemije, sniženje koncentracije triglicerida u jetri, prvo smanjenje, a zatim povećanje sadržaja glikogena u jetri i smanjenje koncentracije beta-hidroksibuterne kiseline i slobodnih masnih kiselina u krvi. Ovi efekti se mogu pripisati aktivaciji ključnih enzima i intenziviranju glukoneogeneze iz glikogenoplastičnih jedinjenja, čime se poboljšava iskorištavanje masti u jetri i perifernim tkivima.



Ovakva hormonalna konstelacija vodi metaboličke procese tako da je u masnom tkivu dominantan proces lipolize, a u jetri glukoneogeneza i lipogeneza. Izostanak lipogenog dejstva insulina na masno tkivo dovodi do nastanka dominacije lipolitičkih hormona (glukagon i somatotropni hormon) i jačanja procesa lipomobilizacije. Intenzitet lipomobilizacije u ranom postpartalnom periodu više je vezan za količinu deponovanih masti, nego za stvarne potrebe u energiji, što za posljedicu ima zamašćenje jetre i narušavanje njenog morfološkog i funkcionalnog integriteta (Šamanc i sar., 2005b).

Nivo somatotropnog hormona krajem graviditeta raste, maksimum se dostiže u vrijeme porođaja, nakon čega dolazi do smanjenja, ali ipak do koncentracija iznad onih tokom najvećeg dijela graviditeta (sa izuzetkom završne faze) (Zulu i sar., 2002b). Povišen nivo somatotropnog hormona tokom peripartalnog perioda i sniženje insulinemije smanjuju stepen lipogeneze u masnom tkivu kočeci djelovanje ključnih enzima koji upravljaju ovim procesima (Hart i sar., 1978; McNamara i Hillers, 1986; Bauman i Vernon 1993), kao što je acetil-koenzim A- karboksilaza (Vernon i sar., 1991). Lipolitičko djelovanje somatotropnog hormona potencirano je hipoinsulinemijom (Bell, 1995). Tretman somatotropinom stimuliše proces glukoneogeneze u jetri, što se tumači njegovim antiinsulinskim djelovanjem (Cohick i sar., 1978; Boisclair i sar., 1989; Knapp i sar., 1992). Somatotropni hormon u jetri stimuliše sintezu IGF-I, što predstavlja osnovu rada sistema somatotropni hormon - IGF-I (Jones i Clemons, 1995). Sa smanjenjem osjetljivosti perifernih tkiva na djelovanje somatotropnog hormona zbog postojanja negativnog bilansa energije (Donaghy i Baxter, 1996), na početku laktacije dolazi do snižavanja koncentracije IGF-I, iako je nivo somatotropnog hormona u porastu (Vicini i sar., 1991; Radcliff i sar., 2003).

Koncentracija somatotropnog hormona raste tokom perioda pothranjivanja (odnosno negativnog bilansa energije), što je dokazano kod svinja (Buonomo i Baile, 1991), ovaca (Thomas i sar., 1990) i goveda (Breier i sar., 1986). Ovi autori navode da je to rezultat uticaja stresa i hipoglikemije na lučenje somatotropnog hormona iz hipofize. U prilog tome idu i rezultati do kojih su došli Gluckman i Breier (1987), koji su kod junadi hranjene koncentratima u količini od 1% tjelesne mase ustanovili višu koncentraciju somatotropnog hormona u odnosu na junad koja su dobijala isti obrok u

količini od 3% tjelesne mase. Kod prve grupe junadi ustanovljena je niža koncentracija IGF-I, što ukazuje na djelimičnu rezistenciju jetre i perifernih tkiva na djelovanje somatotropnog hormona, kao mehanizam kojim gladovanje (tj. negativan bilans energije) dovodi do sniženja koncentracije IGF-I u krvi. Dodatno objašnjenje za djelovanje ovog mehanizma daje Lucy (2000), koji je ustanovio da je opadanje koncentracije IGF-I u krvi tokom perioda rane laktacije praćeno smanjenjem koncentracije mRNA za IGF-I i receptore za somatotropni hormon u tkivu jetre, posebno za receptor ST 1A, koji je odgovoran za vezivanje somatotropnog hormona u jetri i produkciju IGF-I u jetri.

Jorritsma i saradnici (2003) navode da negativan bilans energije preko pojačanog oslobađanja neuropeptida Y (NPY) ima za posljedicu pojačano lučenje somatotropnog hormona, te je za očekivati povećanje koncentracije IGF-I. Do toga ne dolazi zbog hipoinsulinemije i rezistencije perifernih tkiva, prije svega jetre, na djelovanje somatotropnog hormona, kao i smanjene sintetske sposobnosti hepatocita koji su "zagušeni" mastima mobilisanim iz tjelesnih depoa (McGuire i sar., 1995).

IGF sistem se sastoji od liganda (IGF-I i IGF-II), receptora (IGF-IR i IGF-IIR), proteina nosača (*IGF-binding proteins*, IGFBP), kao i proteaza za IGFBP (Daughaday i sar., 1987; McCusker i sar., 1991; Clemmons, 1997; Hossner i sar., 1997). Proteini nosači su glavni regulatori aktivnosti IGF u cirkulaciji, preko stimulacije ili inhibicije njihovog oslobađanja u tkivima (Spicer i Echterkamp, 1995; Lucy, 2000). Takođe, oni predstavljaju depo iz kojeg se IGF postepeno oslobađaju tokom vremena. S obzirom na relativno malu molekulsku masu IGF, prisustvo proteina nosača ograničava njihov prolazak kroz zidove kapilara, glomerularnu filtraciju, ali i vezivanje za membranske receptore u perifernim tkivima (Zulu i sar., 2002b). Zapf i saradnici (1984) navode da prisustvo proteina nosača inhibira ispoljavanje akutnih efekata slobodnih molekula IGF u tkivima. Jones i Clemmons (1995) i Clemmons (1997) dalje navode da i sami IGFBP ispoljavaju fiziološke uloge, nezavisne od IGF. Kod ljudi i domaćih životinja opisano je 6 tipova IGFBP (-1 do -6), ali je najveći dio molekula IGF (preko 95%) u cirkulaciji vezan za IGFBP-3 (Ballard i sar., 1989; Lackey i sar., 1999; Schams i sar., 1999).

Ligandi IGF sistema se proizvode u jetri (IGF-I koji se nalazi u sistemskoj cirkulaciji) i drugim tkivima (u kojima se potom najvećim dijelom i koriste) (D'Ercole i sar., 1984; Murphy i sar., 1987; Thissen i sar., 1994). Hormon rasta je glavni regulator

sinteze IGF-I u jetri, kao i njegove koncentracije u perifernoj krvi. Sekrecija IGF-I iz jetre u potpunosti je zavisna od stimulacije somatotrofnim hormonom, što potvrđuju i podaci koje navode Zulu i saradnici (2002b), da se koncentracija IGF-I u krvi smanjuje u stanjima hipopituitarizma i povećava u stanjima sa povišenom sekrecijom somatotrofnog hormona. Ipak, ova zakonitost može biti modifikovana u stanjima posebnog metaboličkog opterećenja organizma, kada jetra i periferna tkiva postaju rezistentna na djelovanje somatotrofnog hormona. Prema podacima koje navode Renaville i saradnici (2002) i Filipović i Stojević (2011), rezistencija jetre i perifernih tkiva na djelovanje somatotrofnog hormona tokom perioda negativnog bilansa energije je jedan od homeostatskih mehanizama kojim se koče anabolički efekti somatotrofnog hormona i potencira njegov katabolički efekat na metabolizam masti.

Studije koje su sproveli Ronge i Blum (1989) i Breukink i Wensing (1998) dokazale su da koncentracija IGF-I u krvi krava može biti modifikovana varijacijama u unosu energije i proteina putem obroka. Zulu i saradnici (2002b) su ustanovili da je koncentracija IGF-I tokom zasušenja i rane laktacije u negativnoj korelaciji sa koncentracijom NEFA, a u pozitivnoj sa koncentracijom uree u krvi. Lucy i saradnici (1992) i Yung i saradnici (1996) navode da je koncentracija IGF-I u krvi krava sa jakim stepenom negativnog bilansa energije, nezavisno od toga da li je uzrokovan gladovanjem ili povećanim potrebama u energiji zbog intenzivne laktacije, niža u odnosu na krave kod kojih je on manje izražen.

Gluckman i saradnici (1987) navode da je koncentracija IGF-I u krvi mliječnih krava stabilna tokom dana i da ne trpi značajnije dnevne varijacije čak i u slučaju gladovanja. Ipak, Wathes i saradnici (2007) smatraju da sastav i količina konzumiranog obroka imaju značajan uticaj na koncentraciju IGF-I u periodu prije teljenja. Bishop (1994) i Bugarski (2002) navode da koncentracija ovog hormona opada kod krava tokom perioda negativnog bilansa energije, što potvrđuju i rezultati do kojih su došli drugi autori (Breier i sar., 1986; McGuire i sar., 1992; Kasagić i sar. 2011).

McGuire i saradnici (1991b) tokom perioda sredine laktacije nisu ustanovili statistički značajne razlike u koncentraciji IGF-I u krvi krava hranjenih obrokom sa visokim ili niskim sadržajem energije i sirovih proteina. McGuire i saradnici (1995) su kasnije ustanovili da se koncentracija IGF-I u krvi muznih krava u laktaciji tokom prva dva dana gladovanja smanjuje za polovinu. Spicer i saradnici (1990) navode da

kratkotrajno gladovanje dovodi do smanjenja koncentracije IGF-I kod junica, dok su Lucy i saradnici (1992) ustanovili da je koncentracija IGF-I niža kod krava hranjenih obrokom sa manjim sadržajem energije.

Koncentracija IGF-I u krvi je u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijama glukoze i insulina, ocjenom tjelesne kondicije i tjelesnom masom krava, a u negativnoj sa koncentracijama NEFA i ketonskih tijela (Rutter i sar, 1989; Nishimura i sar., 2000; Zulu i sar., 2002b). Ovakav odnos sa indikatorima energetskeg statusa govori u prilog pozitivnoj korelaciji između koncentracije IGF-I i energetskeg bilansa jedinke, koju su ustanovili Ginger i saradnici (1997) i Beam i Butler (1998, 1999). Spicer i saradnici (1990) i Breukink i Wensing (1998) navode da je koncentracija IGF-I u krvi krava sa negativnim bilansom energije tokom prvih 12 nedelja laktacije niska, da bi nakon toga, sa poboljšanjem energetskeg statusa postepeno rasla. Pored uticaja na sintezu i sekreciju IGF-I u jetri i rezistenciju perifernih tkiva na somatotropni hormon, negativan bilans energije na IGF sistem utiče i preko IGFBP. Tokom perioda negativnog bilansa energije ustanovljeno je opadanje relativne zastupljenosti IGFBP-3 i povećanje relativne zastupljenosti IGFBP-1 i IGFBP-2, koji inhibiraju oslobađanje IGF-I u perifernim tkivima (Clemmons i sar., 1989; McCusker i sar., 1991; Gallaher i sar., 1992). Smanjenje relativne zastupljenosti IGFBP-3, kao glavnog nosača, može se protumačiti kao pokušaj organizma da poveća dostupnost preostalog IGF-I perifernim tkivima (Zulu i sar., 2002b). Ovom mehanizmu u prilog govore i rezultati do kojih su došli Elsasser i saradnici (1988), koji su kod teladi u uslovima smanjenog unosa hrane i prisustva parazita ustanovili smanjeno vezivanje IGF-I.

Koncentracija IGF-I u krvi visokomliječnih krava varira u zavisnosti od stadijuma laktacije, tako da su najniže vrijednosti registrovane na samom početku laktacije, da bi se sa napredovanjem laktacije postepeno povećavale i dostigle maksimum u zasušanju (Sharma i sar., 1994). Kao faktor koji, pored smanjene sinteze, potencira opadanje koncentracije IGF-I u krvi tokom perioda rane laktacije, Hadsell i saradnici (1993) navode da njegova koncentracija u kolostrumu može dostići i dvadeset puta veću vrijednost u odnosu na koncentraciju u krvi, kao posljedica aktivnog prelaska iz krvi kroz epitel mliječne žlijezde.

Pad nivoa IGF-I prati pad nivoa insulina, i započinje oko dvije nedelje pred teljenje, a za to vrijeme postoji porast nivoa somatotropnog hormona (Bell, 1995).

Butler i saradnici (2003) navode da je insulin važan regulator sekrecije IGF-I u jetri, te se pored smanjene osjetljivosti ćelija jetre na dejstvo somatotropnog hormona kao razlog pada njihovog nivoa u krvi može uzeti i hipoinsulinemija. Izostanak inhibitornog dejstva IGF-I na sekreciju somatotropnog hormona potencira povišenje koncentracije ovog hormona i dodatno smanjenje nivoa IGF-I, što dovodi do nastanka lipomobilizacije u masnom tkivu i preusmjerenja energije ka mliječnoj žlijezdi. Insulin stimuliše sintezu IGF-I u hepatocitima indirektno, preko povećanja broja receptora za somatotropni hormon, ali i direktnim putem, povećavajući stabilnost iRNK za IGF-I (Goya i sar., 2001; Filipović i Stojević, 2011). Pri tome je važno naglasiti da uticaj insulina na sintezu IGF-I u jetri zavisi od koncentracije insulina u portalnom krvotoku jetre, a ne od njegove koncentracije u sistemskom krvotoku (Maes i sar., 1986; Scott i Baxter, 1986; Hanaire-Broutin i sar., 1996). Kortikosteroidi dovode do smanjenja koncentracije IGF-I u krvi krava, što su potvrdili Maciel i saradnici (2001) nakon aplikacije deksametazona kod muznih krava. Ovaj efekat se ostvaruje posredno, preko inhibicije ekspresije iRNK za receptore za somatotropni hormon u ćelijama jetre (Beauloy i sar., 1999). Opisani uticaji koncentracija insulina i kortikosteroida na lučenje IGF-I, zajedno sa rezistencijom na somatotropni hormon, neki su od mehanizama koji dovode do opadanja koncentracije IGF-I tokom peripartalnog perioda.

Leptin je tkivni hormon proteinske prirode, kojeg stvaraju adipociti (Spicer, 2001). Povišenje njegove koncentracije je u korelaciji sa povećanjem količine masnog tkiva, odnosno energetske bilansom, što je dokazano kod više životinjskih vrsta (Friedman i Hallas, 1998; Erhardt i sar., 2000; Block i sar., 2001; Chillard i sar., 2005). Koncentracija leptina u krvnoj plazmi nakon uzimanja obroka se nalazi u pozitivnoj korelaciji sa glikemijom, a u negativnoj sa koncentracijom beta-hidroksibutirata. Insulin i glukokortikosteroidi potenciraju lučenje leptina i povišenje njegove koncentracije u krvi, dok se u odnosu na koncentraciju NPY, poznatog stimulatora unosa hrane, nalaze u negativnoj korelaciji (Houseknecht i sar., 1998). Lucy (2000) navodi da je jedan od regulatora lučenja NPY i somatotropni hormon, te da se njihove koncentracije nalaze u pozitivnoj korelaciji. Visok nivo leptina preko centralnog nervnog sistema utiče na smanjenje unosa hrane (Friedman i Hallas, 1998; Ahima i Filler, 2000; Schwartz i sar., 2000). Tokom gladovanja nivo leptina se smanjuje (Lord i sar., 1998; Ahima i sar., 1999). Block i saradnici (2001) su na osnovu praćenja koncentracije leptina u periodu

od 35 dana prije do 56 dana nakon teljenja ustanovili da se koncentracija leptina u krvi održava stabilnom sve do druge nedelje pred teljenje, kada počinje postepeno da opada, da bi nakon teljenja opala na polovinu prepartalnih vrijednosti. Ovako snižen nivo leptina održava se sve do osme nedelje nakon teljenja, a kao ključni faktor koji dovodi do pada nivoa leptina ovi autori navode pražnjenje depoa tjelesnih masti pod uticajem negativnog bilansa energije. Nizak nivo leptina u postpartalnom periodu je u vezi sa hipoinsulinemijom, jer insulin povećava ekspresiju iRNK za sintezu peptidnih lanaca leptina (Saladin i sar., 1995; Kolaczynski i sar., 1996; Boden i sar., 1997). Nastanak hipoleptinemije potencira i visok nivo somatotropnog hormona (zajedno sa rezistencijom tkiva na njegovo djelovanje), koji preko niskog nivoa IGF-I i hipoinsulinemije smanjuje njegovo lučenje. Sniženje koncentracije leptina do kojeg dolazi u postpartalnom periodu može djelimično da pospješi apetit, koji je u to vrijeme smanjen. Chillard i saradnici (2001) smatraju da je ovo dejstvo posredno i funkcioniše na sljedeći način: nedovoljan unos hrane dovodi do snižavanja koncentracije leptina, što podiže kortizolemiju; stanje negativnog bilansa energije koje predstavlja stres za organizam, potencira lučenje kortizola; podizanje kortizolemije ima za posljedicu mobilizaciju masti i proteina, stimulaciju glukoneogeneze i promjenu u ponašanju životinje u smislu pojačanog unosa hrane; unos hrane stimuliše lučenje insulina, koji zajedno sa kortizolom pojačava deponovanje masti i lučenje leptina; sa porastom koncentracije leptina kortizolemija i insulinemija se vraćaju u fiziološke okvire, čime se ponovo uspostavlja homeostaza, ali na novom, višem nivou.

Progresivni porast koncentracije estradiola u kasnom graviditetu, koji dostiže maksimum oko dva dana pred teljenje (Tucker, 1985), može doprinijeti smanjenju apetita u peripartalnom periodu i pojačanju intenziteta lipomobilizacije (Forbes, 1986). Ovaj efekat ne zavisi od bilansa energije i unosa hrane, te tako hiperestradiolemija postaje potencijalni etiološki faktor u zamašćenju jetre krava (Grummer i sar., 1990).

### **2.3.1. Aktivnost tireoidee u peripartalnom periodu**

S obzirom na značaj aktivnosti tireoidee u regulaciji prometa energije, kao i činjenicu da je najveći procenat poremećaja zdravlja visokomliječnih krava u peripartalnom periodu vezan upravo za poremećaje energetskog metabolizma, tireoidni

hormoni zauzimaju posebno mjesto u istraživanjima koja se odnose na ovu problematiku.

Koncentracija tireoidnih hormona u krvi visokomliječnih krava podložna je cirkadijalnim i ultradijalnim varijacijama (Bitman i sar., 1994), a na nju utiče niz ambijentalnih faktora, kao što su temperatura sredine (McGuire i sar., 1991a), sastav i unos obroka (Richards i sar., 1995; Tiirats, 1997; Awadeh i sar., 1998). Pored stadijuma laktacije, odnosno faze proizvodno-reproduktivnog ciklusa, koncentracija tireoidnih hormona uslovljena je i snabdjevenošću jodom i selenom (Wichtel i sar., 1996; Awadeh i sar., 1998), učešćem skroba i masti u obroku (Romo i sar., 1997; Blum i sar., 2000), kao i prisustvom prirodnih ili sintetskih goitrogena (Gennano-Soffietti i sar., 1988; Bernal i sar., 1999; Thrift i sar., 1999 a,b; Browning i sar., 1998, 2000).

Tabachnick i Korcek (1986) navode da slobodne masne kiseline inhibiraju vezivanje tiroksina za proteine nosače u krvnom serumu ljudi, što potvrđuje da masne kiseline mogu učestvovati u regulaciji transporta tiroksina u krvi. Ovaj efekat slobodnih masnih kiselina svakako treba uzeti u obzir prilikom razmatranja uticaja intenzivne lipomobilizacije na koncentraciju tireoidnih hormona u sistemske cirkulaciji i genezu hipofunkcije tireoidee u postpartalnom periodu.

McGuire i saradnici (1991a) navode da koncentracija tireoidnih hormona tokom perioda gladovanja ima tendenciju opadanja. Flier i saradnici (2000) ističu da gladovanje kod glodara dovodi do razvoja primarnog hipotireodizma, zbog inhibicije oslobađanja TRH iz hipotalamusa, kao i inhibicije glikozilacije molekula tireotropnog hormona. Takav tireotropni hormon ima manju biološku aktivnost, te dolazi do primarne inhibicije aktivnosti tireoidee i snižavanja koncentracije tireoidnih hormona. Capuco i saradnici (2001) i Cassar-Malek i saradnici (2001) se slažu da je ovo jedan od mehanizama koji povezuje negativan postpartalni bilans energije sa niskim koncentracijama tireoidnih hormona ustanovljenim kod krava tokom rane laktacije. U prilog tome govore i rezultati do kojih su došli Grum i saradnici (1996), koji su ustanovili da se koncentracije oba tireoidna hormona u krvi snižavaju tokom perioda negativnog bilansa energije. Ovi autori su ustanovili da povećanje energetske gustine obroka dodavanjem masti pozitivno utiče na povećanje koncentracije trijodtironina, dok dodatne količine koncentrata u obroku nisu imale uticaja na koncentraciju trijodtironina, ali su dovele do povećanja koncentracije tiroksina.

Aktivnost tireoidee u peripartalnom periodu ima značajnu ulogu u patogenezi metaboličkih poremećaja krava u tom periodu, kao i samog toka laktacije (Šamanc i sar., 1988). Veći broj autora (Blum i sar., 1983; Kunz i sar., 1985; Nikolić i sar., 2000) ukazuje na pozitivnu korelaciju nivoa hormona tireoidee u krvi i energetske bilansa i negativnu korelaciju između njihovog nivoa i mliječnosti, te da su koncentracije trijodtironina i tiroksina u uslovima negativnog bilansa energije i intenzivne lipomobilizacije značajno niže od fizioloških vrijednosti. U periodu oko teljenja naročito je izražen pad koncentracije trijodtironina. Kod zdravih krava ovo smanjenje postoji, ali koncentracije trijodtironina i tiroksina ostaju unutar fizioloških okvira (Furll i Schafer, 1993), što nije slučaj kod ketoznih krava, kod kojih ovo smanjenje ide ispod donje fiziološke granice.

Koncentracija tireoidnih hormona u krvi krava tokom graviditeta je visoka, da bi se neposredno prije i nakon teljenja smanjila, te krave ulaze u funkcionalno hipotireoidno stanje (Jovanović i sar., 1988; Stojić i sar., 2001). Snižanje koncentracije tireoidnih hormona u peripartalnom periodu predstavlja adaptivni mehanizam kojim organizam pokušava da se prilagodi, odnosno da uspori metaboličke procese intenzivirane zbog povećanih potreba u energiji. Ovaj adaptivni mehanizam omogućava iskorištavanje tjelesnih rezervi masti i proizvodnju velikih količina mlijeka. U pogledu homeoretskih procesa, ovaj mehanizam je koristan, ali kada se koncentracija tireoidnih hormona spusti ispod donje fiziološke granice, on postaje značajan etiopatogenetski faktor u nastanku poremećaja zdravlja. Razlog za to je nekontrolisana lipomobilizacija i nakupljanje masti u parenhimatoznim organima, prvenstveno jetri.

Snižanje koncentracije tireoidnih hormona nastaje, između ostalog, i zbog izmjene odnosa trijodtironina i reverznog trijodtironina, stvorenih na periferiji od tiroksina. Životinje u ranoj laktaciji imaju statistički značajno niže koncentracije tiroksina u odnosu na kasnije faze laktacije (45,1 nmol/L), pri čemu one postepeno rastu kasnije tokom laktacije. Sličan trend ima i koncentracija trijodtironina, koja je u kasnoj laktaciji značajno viša u odnosu na ranu (1,93 prema 1,71 nmol/L) (Tiirats, 1997). Ustanovljena je i negativna korelacija između koncentracije tireoidnih hormona i mliječnosti. Poznavanju mehanizma ove korelacije doprinose rezultati do kojih je došao Maurer (1982), da trijodtironin ima sposobnost da u *in vitro* uslovima preko smanjenja koncentracije iRNK za prolaktin u kulturi ćelija hipofize inhibira sintezu prolaktina.



Smatra se da su niske koncentracije tireoidnih hormona u krvi tokom rane laktacije posljedica velikih metaboličkih zahtjeva zbog rastuće proizvodnje mlijeka (Nixon i sar., 1988). Ipak, i pored postojanja sistemskog hipotireoidizma, životinje tokom rane faze laktacije stalno povećavaju količinu proizvedenog mlijeka. Rastuća sekrecija mlijeka podiže nivo metabolizma u mliječnoj žlijezdi koja "skuplja" tireoidne hormone (prvenstveno tiroksin) iz krvi, kako bi održala eutireoidno stanje.

Riis i Madsen (1985) smanjenu sekreciju tiroksina smatraju vidom metaboličke adaptacije na negativan bilans energije na početku laktacije i potencijalno ključnim procesom u prilagođavanju perifernih tkiva na povećane metaboličke zahtjeve mliječne žlijezde. Nikolić (1996) smatra da zbog smanjene aktivnosti tireoidnih hormona u krvi dolazi do opadanja prometa energije na sistemskom nivou, kao i nivoa bazalnog metabolizma. Đoković i saradnici (2007) su kod ketoznih krava ustanovili širok raspon individualnih varijacija koncentracije tireoidnih hormona u krvi, što ukazuje na značaj individualnih varijacija u regulaciji rada ose hipotalamus - hipofiza - tireoidea.

Hormoni tireoidee ispoljavaju pozitivan uticaj na lučenje insulina i njegove periferne efekte. Pod uticajem trijodtironina nalazi se transkripcija proteina transportera glukoze koji je transportuju pod dejstvom insulina, a istovremeno su sastavni dio insulinskih receptora u tkivima (Weinstein, 1977). Smanjenje broja receptora tokom peripartalnog perioda (*down regulation*) slabi odgovor tkiva na insulin, posebno u masnom tkivu, gdje zbog izostanka recikliranja receptora izostaje njegov anabolički efekat, a jača lipolitički efekat glukagona i drugih lipolitičkih hormona.

Hormoni tireoidee povećavaju metabolizam glukoze. Istovremeno, oni podstiču degradaciju insulina u jetri, kao i razlaganje glikogena (Sekulić, 1985). Bernal i de Groot (1980) navode da male doze tireoidnih hormona pospješuju sintezu glikogena, dok više dovode do glikogenolize. Isti autori su ustanovili da tireoidni hormoni kontrolišu aktivnost nekih enzima koji učestvuju u metabolizmu ugljenih hidrata, a kao indikator indeksa perifernog djelovanja tireoidnih hormona ističu aktivnost alfa-glicero-fosfat dehidrogenaze.

Kovačević i saradnici (2005) povezuju nisku koncentraciju tireoidnih hormona (naročito trijodtironina) sa postpartalnom hipoinsulinemijom dodatno potenciranom oslabljenim odgovorom tkiva na insulin. Ovu povezanost opisalo je još nekoliko autora (Ford, 1959; Holtenius, 1993; Kovačević, 2000; Šamanc i sar., 2000; Nikolić i sar.,

2001; Pezzi i sar., 2003), koji smatraju da je postpartalni hipotireoidizam fiziološki mehanizam adaptacije organizma na procese laktacije.

Veći broj autora (Đurđević i sar., 1980, 1985; Furl i Schafer. 1993; Nikolić, 1996; Nikolić i sar., 2000) je u svojim radovima ustanovio korelaciju između negativnog bilansa energije, karakterisanog intenzivnom lipomobilizacijom, i sniženja koncentracije tireoidnih hormona. Ova korelacija je posebno izražena kod životinja sa zamašćenjem jetre, što potvrđuju i nalazi Đokovića i saradnika (2007) koji su ustanovili visoko značajnu pozitivnu korelaciju ( $r=0,73$ ) između energetskeg bilansa i koncentracije tireoidnih hormona u krvi. Blum i saradnici (1983) navode da između koncentracije tireoidnih hormona u krvi krava i mliječnosti postoji negativna, a između bilansa energije u vrijeme visoke laktacije i koncentracije tireoidnih hormona pozitivna korelacija. Kovačević i saradnici (2005) su ustanovili visok koeficijent korelacije između koncentracije NEFA u krvi i stepena zamašćenja jetre i kod gojaznih i kod kontrolnih krava, kao i negativnu korelaciju između koncentracije trijodtironina i stepena zamašćenja jetre tokom puerperijuma. U svome istraživanju ovi autori su kod 70% gojaznih i 30% krava optimalne tjelesne kondicije ustanovili hipotireoidizam i visok stepen zamašćenja jetre, što ukazuje da gojaznost nije jedini etiološki faktor koji utiče na pojavu i intenzitet zamašćenja jetre.

Pod uticajem tireoidnih hormona intenzivira se mobilizacija masti iz tjelesnih depoa. Squires (2003) navodi da tireoidni hormoni pojačavaju aktivnost lipoprotein-lipaze u masnom tkivu, što omogućava mobilizaciju deponovanih triacilglicerola i povećava koncentraciju NEFA u krvi. Istovremeno sa povećanjem koncentracije NEFA, pod uticajem tireoidnih hormona dolazi do smanjenja koncentracije holesterola i triglicerida u krvi. Nasuprot tome, prilikom smanjenja koncentracije tireoidnih hormona dolazi do povećanja koncentracije holesterola, triglicerida i fosfolipida u krvi i njihovog pojačanog deponovanja u jetri, što vodi njenom zamašćenju (Guyton i Hall, 2006). Ova pojava predstavlja jedan od etiopatogenetskih mehanizama razvoja zamašćenja jetre visokomliječnih krava, i opisana je od strane više autora (Soler-Argilago i sar., 1978; Kapp i sar., 1979; Đurđević i sar., 1980,1985; Nikolić, 1996; Nikolić i sar., 2000; Šamanc i sar., 2000; Đoković i sar, 2007).

Koncentracija hormona tireoidee, prije svega trijodtironina, je značajan faktor od kojeg zavisi u koje će se metaboličke puteve usmjeriti mobilisane NEFA. Sistemski

hipotireoidizam koji postoji u peripartalnom periodu preko smanjene aktivnosti mitohondrija i pada koncentracije cAMP u hepatocitima smanjuje iskorištavanje triglicerida i potencira njihovo zadržavanje u jetri (Soler-Argilago i sar., 1978). Iskorištavanje triglicerida (i uopšte metabolizam) u hepatocitima se smanjuju, što je dokazano ogledima sa obilježenim oleatom na izolovanim kulturama ćelija jetre hipotireoidnih pacova. Ovi ogledi su dokazali da se proizvodnja obilježenog ugljen-dioksida smanjuje, dok intenzitet ketogeneze ostaje na nivou onog kod eutireoidnih pacova.

Kapp i saradnici (1979) povezuju difuzno zamašćenje hepatocita sa hipotireoidizmom, tumačeći ga smanjenim kapacitetom mitohondrija za oksidaciju masnih kiselina zbog izostanka stimulacije tireoidnim hormonima. Svoje tvrdnje ovi autori potkrepljuju rezultatima istraživanja u kojima su, na osnovu patohistološkog nalaza uzoraka tkiva jetre i koncentracije tireoidnih hormona, ustanovili negativnu korelaciju između stepena zamašćenja jetre i posljedičnog oštećenja hepatocita i koncentracije tireoidnih hormona. Šamanc i saradnici (1988) kao razlog za zamašćenje u uslovima intenzivne lipomobilizacije navode smanjen kapacitet mitohondrija hepatocita da oksidišu prisutne masne kiseline, zbog niske koncentracije trijodtironina. Intenzitet oksidativne fosforilacije u mitohondrijama hepatocita je u jakoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom tireoidnih hormona, te se smatra da je u uslovima negativnog bilansa energije i intenzivne lipomobilizacije sniženje trijodtironina i tiroksina u krvi važan etiopatogenetski faktor u nastanku zamašćenja jetre.

Đoković i saradnici (2007) su kod ketoznih krava ustanovili negativnu korelaciju između koncentracije trijodtironina i slobodnih masnih kiselina u krvi. U uslovima niske koncentracije trijodtironina, kod ketoznih krava stvoreni su preduslovi za intenziviranje lipomobilizacije i nastanak zamašćenja jetre, jer se smanjuje intenzitet oksidacije slobodnih masnih kiselina u Krebsovom ciklusu kako u jetri, tako i u drugim perifernim tkivima. Povezanost hipotireoidizma i postpartalnog ketoznog stanja ogleda se u značajno nižem nivou tireoidnih hormona i kortizola kod ketoznih u odnosu na zdrave krave (Šamanc i sar, 2005c). Isti autori navode da unutar grupe ketoznih krava postoje statistički značajne razlike u koncentracijama tireoidnih hormona kod krava sa vrijednostima koncentracije trijodtironina iznad i ispod 1,3 nmol/L, pri čemu koncentracije glukoze i kortizola nisu pokazivale statistički značajne razlike. Step

zamašćenja jetre je kod svih ketoznih krava bio u negativnoj korelaciji sa koncentracijom trijodtironina (Kapp i sar., 1979; Šamanc i sar., 2000).

Na vezu između hipotireoidizma i zamašćenja jetre ukazuju i rezultati domaćih autora koji su kod krava sa najtežim oblicima zamašćenja jetre ustanovili najniže koncentracije tiroidnih hormona u krvi (Šamanc i sar., 2000, 2010). Kod pojedinih grla se niske koncentracije tiroidnih hormona mogu dovesti u vezu i sa nastankom hepatičke encefalopatije, zbog teških oblika zamašćenja jetre (Kapp i sar., 1979; Pethes i sar., 1985; Šamanc i sar., 2000; Jorritsma, 2003). Šamanc i saradnici (2010) su u svom radu opisali povezanost hipotireoze u prepartalnom periodu sa postpartalnim zamašćenjem jetre, te zaključuju da postoji jasna korelacija između prepartalne hipotireoze i kasnijeg razvoja masne jetre. Njihovim istraživanjem je dokazano postojanje negativne korelacije između koncentracije tiroidnih hormona u periodu zasušenja i stepena postpartalnog zamašćenja jetre.

Selekcija visokomliječnih rasa goveda na povećanje proizvodnje mlijeka uticala je istovremeno na sposobnost i stabilnost hormonske regulacije metaboličkih procesa, te u tom smislu grla sa većom mliječnošću trpe veće metaboličko opterećenje (Kovačević, 2004). Ovaj autor je ustanovio da je kod krava koje su u prethodnoj laktaciji davale prosječno 7608 litara mlijeka, nivo trijodtironina, tiroksina i insulina u visokom graviditetu i ranom puerperijumu bio niži u odnosu na grla koja su u prethodnoj laktaciji dala prosječno 6177 litara mlijeka. Razlike u koncentraciji tiroidnih hormona su pri tome bile statistički značajne, što nije bio slučaj sa koncentracijom insulina.

U literaturi je dostupan veći broj radova koji ukazuju na vezu hormona tiroidee i polnih hormona (Kotz i Herman, 1961; Gardner i sar., 1978; Baloš i Pantić, 1980; Pantić i Sekulić, 1980). Uočeno je da pored posrednog uticaja, preko energetske bilansa, između koncentracije tiroidnih hormona i pojave postpartalne polne aktivnosti postoji i direktna veza. Hipotireoza ima za posljedicu smanjeno lučenje luteinizirajućeg hormona, što rezultuje otežanom ovulacijom i pojavom policističnih jajnika (Arauda i sar., 1976; Sekulić, 1985). Na pozitivnu korelaciju između koncentracije tiroidnih hormona i aktivnosti jajnika ukazuju rezultati autora koji su nakon davanja trijodtironina i tiroksina eutireoidnim životinjama ostvarili hipertrofiju jajnika i materice (Tata i sar., 1963; Oppenheimer, 1979).

Istraživanja bazirana na upotrebi radioaktivnog joda pokazala su da estrogene kod intaktnih, hipofizektomisanih i ovarijektomisanih pacova dovode do stimulacije ugradnje joda u tireoideu (Sekulić, 1985), ali i njegove ekskrecije putem urina, kao i dejodinacije tiroksina (Galaton, 1971). Ovaj efekat se ostvaruje direktnim uticajem na tireoideu, odnosno njenu jodidnu pumpu, s obzirom na to da postoji i kod hipofizektomisanih životinja. Stimulacija aktivnosti jodidne pumpe pod uticajem estrogena se ogleda i u smanjenju razvoja strume kod pacova tretiranih sa PTU (Eskin i Bogdanove, 1956). U literaturi se mogu naći i podaci koji ukazuju na direktan inhibitorni efekat estrogena na sekreciju joda iz tireoidee (Ćirić, 1981; Zaninovich i sar., 1982). Sawhney i saradnici (1978) navode da estradiol monobenzoat ispoljava inhibitorni efekat na štitnu žlijezdu preko inhibicije aktivnosti enzima monodejodinaza koji pretvaraju tiroksin u trijodtironin.

### **2.3.2. Aktivnost dejodinaza u jetri i perifernim tkivima u peripartalnom periodu**

Aktivnost tireoidee tokom različitih faza proizvodno-reproduktivnog ciklusa goveda je do sada određivana na osnovu koncentracije ukupnih i slobodnog dijela tireoidnih hormona u krvi životinja. Koncentracija slobodnog dijela tireoidnih hormona predstavlja stvarni indikator tireoidnog statusa jedinke, s obzirom na činjenicu da samo slobodni dio hormona ostvaruje metaboličku aktivnost (Christofides i sar., 1999; Villar i sar., 2002).

Promjene koncentracije tiroksina u sistemskoj cirkulaciji koje nastaju u vezi sa intenzitetom metabolizma i energetske bilansom odražavaju promjene u stvaranju i sekreciji tiroksina uslovljene sekrecijom tireostimulirajućeg hormona (centralna regulacija, Riis and Madsen, 1985), ali i odnos između aktivacije i inaktivacije tiroksina u perifernim, ekstratireoidnim, tkivima (periferna autoregulacija, Pethes i sar., 1985; Capuco i sar., 2001; Cassar-Malek i sar., 2001; Huszenica i sar., 2002). Capuco i saradnici (2008) navode da je osjetljivost tkiva na djelovanje tireoidnih hormona uslovljena intenzitetom aktivnosti dejodinaza i ekspresijom receptora u jedru za tireoidne hormone. Kaplan (1986) navodi da je aktivacija, odnosno deaktivacija tiroksina pod dejstvom  $5'$ , odnosno  $5'$ -dejodinaze veoma važna kontrolna tačka u regulaciji metaboličkog statusa jedinke.

Dejodinacija tiroksina u perifernim tkivima može da se vrši pod dejstvom dva enzima, 5'-dejodinaze, kada nastaje trijodtironin i 5-dejodinaze, kada nastaje reverzni trijodtironin (rT<sub>3</sub>), kao metabolički neaktivan oblik. Na taj način se potencira, odnosno inhibira aktivnost tireoidnih hormona u pojedinim tkivima (Capuco i sar., 2008). Iako su u krvi redovno prisutna sva tri oblika tireoidnih hormona, metaboličku aktivnost ispoljava samo trijodtironin (Dickson, 1990; Flier i sar., 2000; Huszenica i sar., 2002).

Capuco i saradnici (2008) i Considine (2009) navode da postoje tri tipa dejodinaza. Aktivnost dejodinaza tipa I (DIO1) najveća je u samoj tireoidei, jetri i bubrezima, i odgovorna je za nastanak najvećeg dijela trijodtironina u sistemskoj cirkulaciji. Dejodinaze tipa II (DIO2) odgovorne su za perifernu aktivaciju ili inaktivaciju tiroksina, a lokalizovane su u centralnom nervnom sistemu, hipofizi, mrkom masnom tkivu, skeletnim mišićima, srcu i placenti (St Germain, 1994; Gereben i sar., 2008). Njihov efekat namijenjen je stvaranju ili inaktivaciji tireoidnih hormona na nivou tkiva u kojima su lokalizovane. Treći tip dejodinaza (DIO3) najvišu aktivnost ispoljava u placenti, tkivima fetusa i materici, a vrši isključivo inaktivaciju tireoidnih hormona, čime štiti embrionalna tkiva od izlaganja visokim koncentracijama trijodtironina (St Germain, 1994), te na taj način omogućava maturaciju tireoidne osovine (Hernandez i sar., 2006). Beckett i saradnici (1993) navode da dejodinaza tipa I ima visoku aktivnost u tireoidei ljudi, glodara i pasa, dok je njena aktivnost kod većine drugih vrsta, kao što su ovce, koze i goveda vrlo niska ili uopšte ne postoji. Aceves i Valverde (1989), Capuco i saradnici (1989), Kahl i saradnici (1993) i Jack i saradnici (1994) navode da je DIO2 dominantan tip dejodinaza u tkivu mliječne žlijezde, dok u jetri krava dominira DIO1. Connor i saradnici (2005) su ustanovili visoku koncentraciju iRNK za DIO3 u tkivu mliječne žlijezde goveda, što ukazuje da je ovaj enzim zastupljen i u ovom tkivu, te da u određenim fazama laktacije ispoljava svoju aktivnost.

Specifična tkivna distribucija različitih tipova dejodinaza ukazuje da oni imaju važnu ulogu u sistemskoj i lokalnoj distribuciji aktivnog trijodtironina (Köhrle, 2000; Squires, 2003). Bianco i saradnici (2002) smatraju da je dostupna lokalna koncentracija trijodtironina u tkivima uslovljena prije svega pretvaranjem tiroksina u metabolički aktivan trijodtironin uz pomoć 5'-dejodinaze ili neaktivni reverzni trijodtironin djelovanjem 5-dejodinaze. Chassande (2003) navodi da lokalne varijacije u koncentraciji trijodtironina mogu biti determinisane modifikacijama u aktivnosti

dejodinaza, među koje se može ubrojati i transkripciona i posttranslaciona kontrola ekspresije DIO1.

Considine (2009) navodi da na odnos dejodinaza unutrašnjeg (5-dejodinaza) i spoljašnjeg prstena (5'-dejodinaza) utiče niz faktora (lijekovi, traume, opekotine, febrilna stanja), od kojih se kao posebno važan za životinje može izdvojiti gladovanje, odnosno negativan bilans energije. Svi pomenuti faktori dovode do porasta koncentracije reverznog trijodtironina, čime se snižava bazalni metabolizam i šteti energija. Isti autor navodi da tokom gladovanja ili bolesnih stanja, sekrecija tiroksina ostaje na približno jednakom nivou uprkos smanjenju koncentracije trijodtironina u krvi, što ukazuje da ne dolazi do aktivacije negativne povratne sprege na hipotalamo-hipofizno-tireoidnoj osi. Ipak, postavlja se pitanje da li postoje još neki faktori koji mogu uticati na odnos ova dva enzima, što bi pomoglo u razjašnjavanju etiopatogeneze poremećaja energetskog metabolizma visokomliječnih krava.

Squires (2003) navodi da je PTU snažan inhibitor aktivnosti DIO1, dok se aktivnost sva tri tipa dejodinaza može suprimirati dejstvom iopanoata. Köhrle (2000) je ustanovio da su specifični inhibitori aktivnosti DIO1 PTU, jodoacetat i aurotioglukoza, kod DIO2 tiroksin i reverzni trijodtironin, dok se aktivnost DIO3 može inhibirati jedino djelovanjem iopanoata. Foster i saradnici (2000) navode da DIO1 i DIO2 imaju različitu osjetljivost prema inhibitornom djelovanju PTU i aurotioglukoze. Aktivnost DIO1 u reakciji sa reverznim trijodtironinom ili tiroksinom kao supstratom se lako inhibira dejstvom pomenuta dva inhibitora (Santini i sar., 1992; Beckett i Arthur, 1994), dok je aktivnost DIO2 relativno otporna na njihovo djelovanje (St. Germain, 1994). Stoga se pomenuti inhibitori često koriste u svrhu utvrđivanja tipa dejodinaza prisutnih u nekom tkivu.

Romo i saradnici (1997) navode da neke masne kiseline mogu inhibirati aktivnost 5'-dejodinaze u jetri, što, u uslovima intenzivne lipomobilizacije i nakupljanja slobodnih masnih kiselina u jetri, može predstavljati dodatni faktor koji snižava aktivnost jetrine DIO1, a sa njom i koncentraciju trijodtironina u sistemske cirkulaciji. Ovom mehanizmu nastanka hipotireoze treba pridodati i ranije pomenuti uticaj slobodnih masnih kiselina na transport tiroksina u krvi (Tabachnick i Korcek, 1986).

Izmjene u intenzitetu konverzije tiroksina u trijodtironin na lokalnom nivou, uslovljene aktivnošću dejodinaza u pojedinim tkivima, predstavljaju jedan od glavnih

mehanizama na osnovu kojeg se ostvaruje metabolički prioritet mliječne žlijezde tokom uspostavljanja i održavanja laktacije. Istraživanja sprovedena na pacovima ukazala su da tokom perioda tranzicije iz zasušenja u laktaciju dolazi do smanjenja intenziteta 5'-dejodinacije u tkivu jetre, uz istovremenu pojačanu lokalnu aktivnost dejodinaza u tkivu mliječne žlijezde, čime se omogućava njegova intenzivna aktivnost i porast proizvodnje mlijeka (Kahl i sar., 1987; Aceves i Valverde, 1989; Jack i sar., 1994). Isti autori su ustanovili da je intenzitet dejodinacije u tkivu mliječne žlijezde bio proporcionalan proizvodnji mlijeka, odnosno veličini legla.

Capuco i saradnici (1999) su dokazali da je prisustvo tireoidnih hormona neophodno za odgovor tkiva mliječne žlijezde na prolaktin i somatotropin, te da postoji potencirajući efekat pomenutih galaktopoetskih hormona na aktivnost DIO2 i stepen dejodinacije tiroksina u mliječnoj žlijezdi. U skladu sa ovim nalazom, može se smatrati da je stimulacija lokalne aktivnosti DIO2 pod dejstvom galaktopoetskih hormona jedan od mehanizama kojim egzogena aplikacija ovih hormona stimuliše proizvodnju mlijeka (Capuco i sar., 1989).

U stanjima energetske deficita homeoretski mehanizmi potenciraju procese aktivacije tireoidnih hormona u pojedinim tkivima, čime se obezbjeđuje njihov metabolički prioritet. Kod visokomliječnih krava to je naročito izraženo u ranom postpartalnom periodu, kada mliječna žlijezda u uslovima negativnog bilansa energije ima metabolički prioritet u odnosu na druga tkiva. Tada je aktivnost dejodinaza u njoj povećana, kako bi se obezbijedilo pravilno funkcionisanje lokalnog energetskeg metabolizma i sinteze velike količine mlijeka. Istovremeno je aktivnost dejodinaza u drugim tkivima smanjena, kako bi se podržao metabolički prioritet mliječne žlijezde i omogućila preraspodjela dostupnih tireoidnih hormona iz cirkulacije u skladu sa potrebama pojedinih tkiva (Huszenica i sar., 2002; Pezzi i sar., 2003). Drugim riječima, tokom perioda rane laktacije mliječna žlijezda se, zahvaljujući aktivnosti homeoretskih mehanizama, održava u eutireoidnom stanju, dok na nivou organizma postoji manje ili više izražena hipotireoza. Važan faktor u održavanju eutireoidnog stanja u mliječnoj žlijezdi jeste homeoretsko dejstvo somatotropnog hormona, koji potencira dejstvo enzima DIO2 u tkivu mliječne žlijezde, koja prevodi tiroksin u metabolički aktivniji trijodtironin, neophodan za održavanje metabolizma u mliječnoj žlijezdi (Capuco i sar., 1989; Kahl i sar., 1995).



Slebozinski i saradnici (1999) navode da je stanje fiziološke hipotireoze u suprotnosti sa porastom proizvodnje mlijeka uslovljenim povećanom koncentracijom trijodtironina u tkivu mliječne žlijezde. Prema ovim autorima, u tkivu mliječne žlijezde dominira visoko efikasna i aktivna DIO2, koja omogućava lokalno stvaranje metabolički aktivnog trijodtironina, u cilju podrške laktaciji, i to na račun drugih tkiva, prije svega jetre u kojoj dominira DIO1. U prilog aktivnosti tog mehanizma govori i činjenica da tokom avansnog perioda proizvodnja mlijeka raste i održava se na visokom nivou kod životinja koje se istovremeno nalaze u stanju manje ili više izraženog negativnog bilansa energije (McGuire i sar., 1991a; Yambayamba i sar., 1996). Metabolički prioritet mliječne žlijezde održava se relativno dugo, tokom cijelog prvog trimestra laktacije, što se ogleda u održavanju niskih koncentracija tireoidnih hormona u krvi i nakon prestanka negativnog bilansa energije, odnosno vraćanja koncentracije BHBA i NEFA u fiziološke granice (Eppinga i sar., 1999).

Pezzi i saradnici (2003) su ustanovili donji "pik" aktivnosti jetrine DIO1 u periodu rane laktacije, zatim porast prema kraju laktacije, sa gornjim pikom u zasušenju, dok je aktivnost DIO2 u tkivu mliječne žlijezde imala suprotan trend. Između aktivnosti ova dva enzima ustanovljena je jasna negativna korelacija ( $r=-0,86$ ). Negativna korelacija ustanovljena je i između mliječnosti i aktivnosti dejodinaza u jetri ( $r=-0,77$ ), dok je između mliječnosti i aktivnosti dejodinaza u tkivu mliječne žlijezde postojala pozitivna korelacija ( $r=0,83$ ). Ovi autori smatraju da bi lokalno povećanje potrošnje tiroksina za potrebe mliječne žlijezde, zajedno sa negativnim bilansom energije i inhibicijom aktivnosti DIO1 u jetri, moglo biti jedan od glavnih uzroka nastanka funkcionalnog hipotireoidnog stanja kod krava tokom rane laktacije. Kao potvrdu toga navode jasnu pozitivnu korelaciju između trenda kretanja aktivnosti DIO1 u jetri i koncentracije tireoidnih hormona u krvi, kao i njihovu negativnu korelaciju u odnosu na aktivnost DIO2 u tkivu mliječne žlijezde.

Capuco i saradnici (2008) su tokom najvećeg dijela graviditeta ustanovili nisku ekspresiju iRNK za DIO1 u jetri, da bi u zasušenju došlo do naglog porasta, a odmah nakon teljenja do naglog pada prema 14. danu laktacije. Nakon toga, ekspresija iRNK za DIO1 raste prema kraju ispitivanog perioda. Ovaj nalaz je analogan trendu kretanja koncentracije tireoidnih hormona tokom tranzicionog perioda, koji su opisali Fukuda i saradnici (1980) i Kahl i saradnici (1987). Ekspresija iRNK za DIO2 u mliječnoj

žlijezdi rasla je od niske (tokom graviditeta), prema ranoj laktaciji (14. dan) i piku laktacije (90. dan). Tokom ispitivanog perioda ovi autori nisu ustanovili značajnije varijacije ekspresije iRNK za DIO1 u mliječnoj žlijezdi i iRNK za DIO2 u jetri, pri čemu su njihove vrijednosti ostale na donjoj granici osjetljivosti metode. Ekspresija iRNK za DIO3 u oba tkiva imala je trend blagog porasta od početka ispitivanog perioda prema 35. danu prije porođaja, zatim laganom padu prema porođaju i ranoj laktaciji, kada je dostigla svoje najniže vrijednosti. Od 14. dana laktacije, ekspresija ove iRNK u mliječnoj žlijezdi raste, dok je u tkivu jetre i dalje slijedila trend laganog opadanja. Ovakav trend kretanja ekspresije iRNK za sva tri enzima, kao i njihov međusobni odnos (DIO1/DIO3 i DIO2/DIO3) u skladu je sa trendom kretanja koncentracije tireoidnih hormona u krvi i intenziteta njihove lokalne aktivacije u tkivima jetre i mliječne žlijezde. Na ovaj način je, na molekularnom nivou, prikazan homeoretski mehanizam kojim se ostvaruje metabolički prioritet mliječne žlijezde tokom perioda rane laktacije, odnosno privremeno lokalno eutireoidno stanje u uslovima sistemske hipotireoze. Opisanom mehanizmu svakako treba dodati i uticaj stepena lokalne ekspresije iRNK za tireoidne receptore u pojedinim tkivima, koji dodatno potencira navedene efekte aktivnosti dejodinaza (Capuco i sar., 2008).

### **2.3.3. Mogućnost upravljanja aktivnošću tireoidee kod goveda**

Aktivnost tireoidee je neophodna za odvijanje čitavog niza fizioloških procesa u organizmu preživara, među kojima treba izdvojiti njen uticaj na rast i reproduktivne funkcije (Rhind i McMillen, 1996; Villar i sar., 2002). Tireoidni hormoni preko modulacije intenziteta bazalnog metabolizma utiču na iskorištenost hranljivih materija iz obroka, te time direktno na prirast i druge proizvodne karakteristike. Istovremeno, preko intenziteta prirasta, oni indirektno utiču i na pojavu puberteta.

Upravljanje aktivnošću tireoidee je još uvijek predmet niza istraživanja sa ciljem identifikacije fiziološke uloge tireoidnih hormona i kreiranja protokola za poboljšanje proizvodnih karakteristika životinja (Kirovski i sar., 2008; Györfy i sar., 2009). Dosadašnja istraživanja su uglavnom usmjerena na hipotireozu nastalu pod prirodnim uslovima, nakon tireoidektomije ili aplikacije različitih farmakoloških supstanci (Villar i sar., 2002), dok efekat indukcije hipertireoze davanjem egzogenih tireoidnih hormona eutireoidnim životinjama u literaturi nije detaljnije opisan.

Davis i saradnici (1983, 1987) su nakon aplikacije egzogenog tiroksina postigli povećanje mliječnosti krava, što je prema njihovom mišljenju bio rezultat povećanja protoka krvi kroz vime i povećane dostupnosti hranljivih materija. Današnja saznanja ukazuju da se egzogeni tiroksin pojačano preuzima u mliječnoj žlijezdi, kako bi se održalo lokalno eutireoidno stanje, neophodno za njeno funkcionisanje u uslovima rastuće laktacije (Pezzi i sar., 2003; Capuco i sar., 2008). Takođe, dodati tiroksin pozitivno utiče na stanje jetre i „sagorijevanje“ masti u hepatocitima. Pojačan katabolizam masti u jetri smanjuje stepen prisutnog zamašćenja, čime se omogućava sinteza IGF-I, koji ispoljava pozitivan efekat na obnovu epitela mliječne žlijezde i podstiče njen rad.

*In vivo* studije su ukazale da davanje tireoidnih hormona pozitivno utiče na mliječnost, što je razjašnjeno kasnije, kada je u *in vitro* studijama dokazano da trijodtironin potencira aktivnost drugih laktogenih i galaktogenih hormona (Houdebine i sar., 1978; Bhattacharjee i Vonderhaar, 1984). Stimulacija glukoneogeneze pod dejstvom tireoidnih hormona tokom perioda rane laktacije se posredno, preko sinteze laktoze, može smatrati osnovom jednog od mehanizama kojim tireoidni hormoni podstiču proizvodnju mlijeka.

Pod prirodnim uslovima, hipotireoza kod preživara može nastati zbog nedostatka joda, unosa prirodnih goitrogena ili kao rezultat autoimune reakcije. Nedostatak joda u organizmu životinja je posljedica ishrane biljnim hranivima koja potiču sa terena siromašnih u jodu, što je opisano u radovima domaćih (Jovanović i sar., 1982; Sinadinović i sar., 1996) i stranih autora (Wilson i sar., 1975; Corah i Ives, 1991). Zbog toga od pedesetih godina prošlog vijeka postoji zakonska obaveza jodiranja soli za ishranu ljudi i životinja dodavanjem kalcijum-jodata ili kalijum-jodida (Jovanović, 2007; Čupić i sar., 2007a; Considine, 2009).

Iino i Greer (1961) navode da mliječna žlijezda pacova tokom laktacije akumulira značajne količine joda, čak i u koncentracijama iznad onih u štitnoj žlijezdi. Ovaj efekat svakako doprinosi razvoju hipotireoze na sistemskom nivou, ali ostavlja otvorenim pitanje da li je ova akumulacija vezana samo za izlučivanje joda putem mlijeka ili možda ukazuje na lokalnu sintezu tireoidnih hormona u tkivu mliječne žlijezde. Kada su u pitanju goveda, pored pomenutih, kao faktor koji utiče na akumulaciju joda u mliječnoj žlijezdi treba imati na umu učestalost mastitisa tokom ranog postpartalnog

perioda i tendenciju tkiva zahvaćenih zapaljenskim procesom da akumuliraju značajne količine joda.

Capen i Martin (2003) navode da suficit joda također može imati strumogeni efekat, preko inhibicije fuzije lizozoma i kapljica koloida u folikularnim ćelijama, zbog čega izostaje razgradnja tireoglobulina i oslobađanje tireoidnih hormona u cirkulaciju.

Unos prirodnih goitrogena je vezan uglavnom za ishranu biljkama iz familije *Brassicaceae* (kupus, repa, kelj, uljana repica), koje sadrže glikozinolate, koji se u organizmu pretvaraju u goitirine (5-vinil-oksazolidin-2-tione), supstance koje sprečavaju organifikaciju joda (Barberan i Valderrábano, 1987; Taljaard, 1993). Od sintetskih supstanci goitrogeni efekat mogu ispoljiti tiouracili, sulfonamidi, paraaminobenzoeva kiselina, paraaminosalicilna kiselina i kompleksni anjoni ( $\text{KSCN}^-$ ,  $\text{KClO}_4^-$ ), koji pored inhibicije organifikacije joda inhibiraju i reakciju spajanja jodiranih tirozina u molekule tireoidnih hormona (Capen i Martin 2003; Guyton i Hall, 2006). Snižavanje koncentracije tiroksina u cirkulaciji aktivira mehanizam negativne povratne sprege i pojačano oslobađanje tireostimulirajućeg hormona iz hipofize, te dolazi do hipertrofije i hiperplazije tireoidee, odnosno do razvoja strume. Villar i saradnici (2002) navode da je pojava strume kao posljedice autoimune reakcije na tireoglobulin kod goveda rijetka.

Simptomi hipotireoze nastale pod prirodnim uslovima su veoma različiti, a kao karakteristični se izdvajaju pobačaji, prerana teljenja, produžen graviditet, povećan neonatalni mortalitet i smanjena plodnost. Rast mladunčadi je usporen, tireoidea uvećana, a česta je i pojava neuroloških poremećaja, koji se kod ljudi manifestuju kao endemski kretinizam. Ostali simptomi koji se navode u literaturi su brzo zamaranje, anemija, letargija, alopecija, hiperpigmentacija kože, miksedem, pojava deformiteta kostiju, mišićna slabost, zadebljanje kože i intolerancija na niske temperature (Williams i Hill, 1965; Potter i sar., 1982; Kaciuba-Uscilko i sar., 1987; Hetzel i Mano, 1989; Graham, 1991; Seimya i sar., 1991).

Tireoidektomija je radikalna i ireverzibilna metoda indukcije hipotireoze, koja ima za rezultat akutnu i potpunu eliminaciju tireoidnih hormona iz cirkulacije u roku od nekoliko dana (Villar i sar., 2002). Ova metoda je dosta korištena kod ovaca, kako bi se u uslovima supstitucije različitim dozama tireoidnih hormona ustanovio njihov uticaj na rast vune (Ferguson i sar., 1956, 1965). Pored ireverzibilnosti, ograničenje u primjeni

tireoidektomije u praksi čini česta pojava ektopičnog tkiva tireoidee duž dušnika i u grudnoj duplji, koju su opisali Zdelar i saradnici (1986), koja može imati za posljedicu lučenje izvjesne količine tireoidnih hormona (Parkinson i Follet, 1994). Kako bi se uklonio i ovaj izvor tireoidnih hormona, tireoidektomija se najčešće kombinuje sa aplikacijom radioaktivnog joda ( $^{131}\text{I}$ ), koji vrši totalnu destrukciju preostalog tkiva tireoidee (Ekman, 1965). Uklanjanje paratireoidee, koja se redovno nalazi neposredno uz tireoideu, ili je inkorporisana u njeno tkivo, predstavlja dodatno ograničenje tireoidektomije, jer usljed nedostatka parathormona i kalcitonina može doći do poremećaja metabolizma kalcijuma i fosfora (Bartlet, 1972). Slično kao i kod tireoidee, pojava ektopičnog tkiva paratireoidee je dosta česta, pa njegova kompenzatorna aktivnost u većini slučajeva uspijeva da očuva homeostazu kalcemije (Parkinson i Follet, 1994).

Imajući u vidu navedena ograničenja tireoidektomije, kao metoda izbora za indukciju hipotireoze u eksperimentalne svrhe nameće se upotreba farmakoloških supstanci sa antitireoidnim djelovanjem. Zbog potencijalnog negativnog uticaja na konzumente, antitireoidne supstance su zabranjene kao stimulatori rasta u EU (European Commission, 1981) i SAD (Department of Agriculture, 2001). Prilikom kreiranja eksperimentalnog protokola za indukciju hipotireoze, treba imati u vidu dinamiku sekrecije tireoidnih hormona i njihov promet u tkivima (De Sandro i sar., 1991). Ryder (1979) navodi da je efekat antitireoidnih supstanci, pred upotrebljene doze, uslovljen vrstom i rasom tretiranih životinja, kao i uticajem godišnje sezone. Villar i saradnici (2002) navode da je aktivnost DIO1 u tireoidei goveda niska i u uslovima hipotireoze povećava se samo neznatno, za razliku od ljudi i glodara. Stoga je organizam goveda u uslovima hipotireoze usmjeren na direktnu sintezu trijodtironina u tireoidei i/ili na povećanje aktivnosti DIO1 u jetri i bubrezima.

Od niza supstanci koje mogu inhibirati sintezu, sekreciju i perifernu aktivaciju tireoidnih hormona, u praksi se najčešće koriste tioamidni derivati (tiourea, metimazol, karbimazol, tiouracil, metiltiouracil i PTU). Svi navedeni derivati sadrže tioamidnu (S=C-N) grupu, koja ima sposobnost da inhibira oksidaciju i organifikaciju joda, a time i sintezu tireoidnih hormona. Neki od njih imaju sposobnost da, sa različitom konstantom inhibicije, inhibiraju aktivnost dejodinaza u perifernim tkivima (Villar i sar., 2002). Tioamidni derivati ne utiču na sposobnost tireoidee da preuzima jod iz krvi,

kao ni njenu sposobnost da u krv oslobađa već sintetisane molekule tireoidnih hormona (Haynes i Murad, 1980; Green, 1991; Varagić i Milošević, 2008). Zbog toga je brzina indukcije hipotireoze njihovim djelovanjem, između ostalog, uslovljena količinom hormona deponovanih u folikulima tireoidee, i generalno se mjeri u nedeljama.

Tioamidni derivati imaju tendenciju da se nakupljaju u tkivu tireoidee, te je njihov efekat značajno duži od njihovog vremena poluživota u sistemskej cirkulaciji. Okajima i Ui (1979) navode da ova tendencija omogućava da se stabilno hipotireoidno stanje održava dnevnom aplikacijom tioamidnih derivata. Njihov efekat je reverzibilan, i nakon prestanka tretmana koncentracija tireoidnih hormona se vraća u fiziološke granice u relativno kratkom periodu, pri čemu postoji privremeno kompenzatorno povećanje njihove koncentracije (Rumsey i sar., 1985; Follet i Potts, 1990; Bernal, 1996; DeMoraes i sar., 1998; Thrift i sar., 1999 a,b).

Tiourea (tiokarbamid) u dozi od 50 do 125 mg/kg tjelesne mase kod koza izaziva opadanje koncentracije tireoidnih hormona na nivo koji je ispod mogućnosti detekcije, i to unutar dvije nedelje od početka tretmana (Reddy i sar., 1996). Ovaj efekat je, međutim, povezan sa akutnom toksičnošću tiouree, koja se manifestuje opadanjem tjelesne kondicije, strumom, slabošću, edemom kože lica i ekstremiteta, otupljenošću i naglim uginućima (Ramakrishna i sar., 1994), što je posebno izraženo kod mladih životinja. Green (1991) opisane toksične efekte pripisuje djelovanju cijanamida, koji se oslobađa prilikom razlaganja tiouree. Villar i saradnici (2002) smatraju da zbog izrazitih toksičnih efekata, tiourea nije prikladna za dugoročnu indukcije hipotireoze kod preživara, te da su zbog toga u literaturi podaci o njejoj upotrebi kod ovaca i goveda oskudni.

Metiltiouracil (6-metil-2-tiouracil, MTU), u zavisnosti od primijenjene doze, vrši inhibiciju aktivnosti tireoidee na nivou aktivnosti dejodinaza u perifernim tkivima ili na nivou same tireoidee, što omogućava da se upotrebom različitih doza manipuliše dostupnošću aktivnog trijodtironina u pojedinim tkivima (Visser i sar., 1979; Villar i sar., 2002). Na nivou same tireoidee svi tiouracili djeluju tako što inhibiraju aktivnost enzima tiroperoksidaze, čime onemogućavaju oksidaciju joda, jodinaciju rezidua tirozina u okviru molekula tireoglobulina, te oksidativnu kondenzaciju molekula di- i monojodtirozina u tiroksin i trijodironin (Ćupić i sar., 2007b; Varagić i Milošević, 2008; Kaneko, 2008). Chandrasekhar i saradnici (1985a) i Follet i Potts (1990) su koristili

metiltiouracil kod ovaca u dozi od 35 mg/kg tjelesne mase tokom više mjeseci i postigli indukciju hipotireoze bez klinički manifestnih poremećaja zdravlja, izuzev blage strume koja je nestala nakon prestanka tretmana. Prema njihovim nalazima, koncentracija tiroksina je dostigla donji plato 4-6 nedelja nakon početka tretmana. Slično kao kod tiouree, mlađe životinje su osjetljivije na dejstvo metiltiouracila (Chandrasekhar i sar., 1985b), a upotreba većih doza imala je za posljedicu intenziviranje neželjenih sporednih efekata jake hipotireoze.

Analogno metiltiouracilu, i efekat PTU (6-propil-2-metil-tiouracil) je reverzibilan i dozno zavisn, pri čemu su doze za postizanje efekta približno deset puta manje. Burger i saradnici (1991) i Villar i saradnici (1998) navode da je za dostizanje donjeg platoa koncentracije tireoidnih hormona potrebno 4-6 nedelja tretmana. Istraživanja sprovedena na govedima ukazala su da upotreba PTU u dozama koje ne dovode do inhibicije sinteze tireoidnih hormona na nivou tireoidee (1-2 mg/kg tjelesne mase) dovodi do blagog pada koncentracije trijodtironina i porasta koncentracije tiroksina, kao rezultat inhibicije aktivnosti DIO1 u perifernim tkivima (Rumsey i sar. 1985; Elsasser i sar., 1992). Isti autori su utvrdili da doza PTU od 4 mg/kg tjelesne mase dovodi do inhibicije aktivnosti dejodinaza u perifernim tkivima i sinteze i sekrecije tireoidnih hormona na nivou tireoidee, što je potvrđeno i u istraživanjima drugih autora (Bernal, 1996; DeMoraes i sar., 1998; Thrift i sar., 1999 a,b; Cassar-Malek i sar., 2001). Doza PTU od 4mg/kg dovodi do snižavanja koncentracije tiroksina u krvi na svega 30% od fizioloških vrijednosti (Elsasser i sar., 1992).

U prošlosti, PTU je dosta korišten kao stimulator rasta (Escobar del Rey i Morreale del Escobar, 1961; Escobar del Rey i sar., 1961, 1962; Hershman i Van Middlesworth, 1962; Chopra i sar., 1982). Kod upotrebe nižih doza PTU, nakon inicijalnog opadanja, postiže se povišenje koncentracije tiroksina, uz blagi pad koncentracije trijodtironina u krvi, što uz očuvan apetit, smanjenje bazalnog metabolizma i smanjenu perifernu utilizaciju nutrijenata ima za rezultat povećanje dnevnog prirasta. Ovaj efekat PTU su u *in vivo* ogledima opisali Rumsey i saradnici (1983a, 1985), i dokazali identičan efekat davanja ronela, organofosfata sa antidejodinaznom aktivnošću. Kahl i saradnici (1983, 1984, 1985) dokazali su da ronel i niske doze PTU u *in vitro* uslovima mogu inhibirati 5'-dejodinaciju tiroksina u tkivu jetre i bubrega tovne junadi, čime je potvrđeno postojanje pozitivne korelacije između

koncentracije tiroksina u krvi i dnevnog prirasta tjelesne mase tovne junadi koju su opisali Rumsey i saradnici (1983b).

De Moraes i saradnici (1998), Thrift i saradnici (1999a,b) i Bernal i saradnici (1999) su ispitivali proizvodna i reproduktivna svojstva krava brahman rase nakon perioda hipotireoze izazvane davanjem PTU. Oni su ukazali na jasnu povezanost funkcije tireoidnih hormona i proizvodno-reproduktivnih svojstava krava kao i da nakon prestanka indukcije hipotireoze farmakološkim supstancama dolazi do pojačanja aktivnosti tireoidee, kao kompenzatornog efekta koji ispoljava izvjestan efekat na metabolizam krava, a time i proizvodne i reproduktivne sposobnosti u tom periodu. Ovi autori vršili su ispitivanja na rasi goveda koja je pretežno toвна, što ograničava primjenu njihovih rezultata na krave visokomliječnih rasa.

Villar i saradnici (2002) navode da se efekat upotrebene doze PTU može utvrditi na osnovu odnosa  $T_4/T_3$  u perifernoj krvi, jer inhibicija aktivnosti dejodinaza dovodi do njegovog povećanja, a inhibicija na nivou tireoidee do njegovog smanjenja. Opisane karakteristike omogućavaju da se u istraživanjima jasno razdvoje centralni i periferni efekti upotrebene doze PTU. Pozivajući se na svoje ranije istraživanje (Villar i sar., 1998), ovi autori smatraju da se precizniji zaključak o efektu PTU može donijeti na osnovu mjerenja aktivnosti DIO1 u tkivu jetre i bubrega.

Mlade životinje su osjetljivije na dejstvo PTU u odnosu na starije, što je dokazano ogledima na pacovima (Kariya i sar., 1983) i junadi (Rumsey i sar., 1985). Horger i saradnici (1976) navode da PTU prolazi kroz placentarnu barijeru kod preživara, te kod gravidnih ovaca može dovesti do inhibicije aktivnosti fetalne tireoidee i razvoja strume. Kada je u pitanju specifičnost vrste u pogledu osjetljivosti na dejstvo PTU, Villar i saradnici (2002) su na osnovu sopstvenih istraživanja (Villar i sar., 1998) i podataka iz literature (Nesbitt i sar., 1967; Horger i sar., 1976; Cole i sar., 1994) uspostavili redoslijed koza > goveče > ovca (od najtolerantnije prema najosjetljivijoj vrsti). Doze koje su dovoljne za indukciju hipotireoze kod preživara ne dovode do neuroloških i imunoloških poremećaja koji su registrovani kod pacova tretiranih visokim dozama PTU (Kariya i sar., 1983), što zajedno sa doznom zavisnošću efekta čine PTU supstancom izbora za kontrolisanu i reverzibilnu indukciju hipotireoze kod preživara.

Metimazol (1-metilimidazol-2-tiol) i karbimazol (1-metil-2-imidazoliol etil karbonat) su derivati tiouree koji se koriste za tretman hipertireoze kod ljudi i malih



životinja u dozama koje su za 5-10 puta manje u odnosu na PTU (Okajima i Ui, 1979; Kampmann i Hansen, 1981; Peterson, 1989). Villar i saradnici (2002) navode da je njihova sposobnost za indukciju hipotireoze kod preživara značajno manja u odnosu na nepreživare, što pripisuju značajnom stepenu degradacije ovih supstanci u predželucima. Visser i saradnici (1980) i Symonds i saradnici (1996) smatraju da je manja potentnost metimazola i karbimazola u odnosu na tiouracile posljedica toga što ne utiču na aktivnost dejodinaza u perifernim tkivima. Follet i Potts (1990), upotrebom metimazola u dnevnoj dozi od 1,4mg/kg tjelesne mase, nisu uspjeli izvršiti indukciju hipotireoze kod ovaca, dok se metiltiouracil u tom smislu pokazao kao značajno potentniji. Do sličnih zaključaka došao je Anderson (1971), koji je u istraživanju sprovedenom na mliječnim kravama upotrebom metimazola u dozi od 8,8 mg/kg tjelesne mase ostvario samo blag pad koncentracije tiroksina, bez promjene koncentracije trijodtironina. Burroughs i saradnici (1960) su ispitivali mogućnost indukcije hipotireoze kod junadi upotrebom metimazola, sa ciljem povećanja dnevnog prirasta, i utvrdili da je za postizanje željenog efekta neophodna dnevna doza od 600 mg po životinji, te tretman od najmanje 60 dana. Kako bi se izbjegao efekat kompenzatorne hiperfunkcije tireoidee na ostvareni prirast, ovi autori sugerišu da tretman metiltiouracilom traje do samog dana klanja.

Pored niske potentnosti, ograničenje za upotrebu metimazola za eksperimentalnu indukciju hipotireoze kod preživara predstavlja i njegova toksičnost, posebno izražena kod mladih životinja, koja se manifestuje intolerancijom na visoke temperature okoline, naglim pogoršanjem zdravlja i uginućima (Symonds i sar., 1996). Ibrahim i saradnici (1994) su kod koza kao sekundarni efekat karbimazola ustanovili hepatotoksičnost. Navedene karakteristike metimazola i karbimazola čine ih neprikladnim za upotrebu kod preživara, iako kod ljudi i monogastričnih životinja predstavljaju lijekove izbora (Villar i sar., 2002).

### 3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Cilj ove doktorske disertacije je bio ispitivanje uticaja prepartalne aplikacije PTU na endokrini i metabolički status junica holštajn rase u kasnom graviditetu i ranoj laktaciji.

Radi postizanja cilja postavljeni su sljedeći istraživački zadaci:

- tretirati junice ogledne grupe sa 4 mg PTU/kg tjelesne mase u periodu od 20 dana prije očekivanog teljenja do dana teljenja;
- uzeti uzorke krvi 20 dana prije očekivanog termina teljenja, 3 i 7 dana kasnije, svakodnevno tokom 5 dana prije i 5 dana nakon teljenja, kao i 7., 15., 30. i 60. dana nakon teljenja;
- odrediti koncentracije tireoidnih hormona i insulina u svim uzetim uzorcima krvi;
- odrediti koncentraciju IGF-I u uzorcima krvi uzetim 20., 17., 13., 7. i 4. dana prije i 7., 30. i 60. dana nakon teljenja;
- odrediti relativnu zastupljenost IGFBP-2, IGFBP-3 i IGFBP-4 u uzorcima krvi uzetim 20. i 7. dana pre i 7. i 30. dana nakon teljenja;
- odrediti koncentracije odabranih biohemijskih parametara krvi (u svim uzetim uzorcima odrediti koncentraciju glukoze; u uzorcima uzetim 20., 17., 13., 7., 4. i 1. dana prije, kao i 1., 3., 5., 7., 15., 30. i 60. dana nakon teljenja odrediti koncentracije BHBA i ukupnog bilirubina; u uzorcima uzetim 20., 17., 13., 7. i 4. dana prije, na dan teljenja, kao i 3., 4., 7., 15., 30. i 60 dana nakon teljenja odrediti koncentracije ukupnih proteina i albumina);
- odrediti ekspresiju iRNK za pojedine tipove dejodinaza, stepen zamašćenja i sadržaj glikogena u uzorcima tkiva jetre uzetim perkutanom biopsijom 7. dana prije i 7. dana nakon teljenja od svih junica;
- odrediti dnevnu količinu proizvedenog mlijeka u periodu od 7. do 60. dana laktacije;
- odrediti dužinu trajanja servis perioda;

## 4. MATERIJAL I METODE RADA

### 4.1. Ogledne životinje

Istraživanje je sprovedeno na ukupno 30 visokogravidnih junica holštajn rase. Sve životinje su bile smještene na farmi goveda industrijskog tipa, u vezanom sistemu držanja. Tokom cijelog trajanja istraživanja životinje su bile pod stalnim nadzorom veterinarske službe farme.

Junice su odabrane 30 dana prije očekivanog termina teljenja, i smještene u izdvojenom objektu. Očekivani termin teljenja je određen na osnovu datuma osjemenjavanja. Odabrane junice bile su ujednačene po tjelesnoj kondiciji (antepartalno 3,50), sa tjelesnom masom od 500 do 550 kg. Tjelesna masa junica registrovana je na početku istraživanja. Obje grupe junica su tokom izvođenja eksperimenta dva puta dnevno dobijale kompletan miksirani obrok (TMR), pri čemu su sastav i količina obroka bili usklađeni sa potrebama za datu proizvodno-reproduktivnu fazu, tjelesnu masu i proizvodnju mlijeka. Sastav i nutritivna vrijednost obroka prikazani su u Tabelama 4.1. i 4.2.

Junice ogledne grupe (n=15) su, počevši od 20. dana prije očekivanog termina teljenja do dana teljenja, svakodnevno dobijale PTU (Sigma-Aldrich Chemical Company, Njemačka) u dozi od 4 mg/kg tjelesne mase. PTU je davan specijalnom špatulom za peroralno davanje lijekova, pomiješan sa 25 ml maltoznog sirupa. Davanje maltoznog sirupa i PTU vršeno je uvijek u istom periodu dana, 4 sata nakon davanja jutarnjeg obroka.

Kontrolnu grupu (n=15) činile su junice koje su od 20. dana prije očekivanog termina teljenja do dana teljenja svakodnevno peroralno primale po 25 ml maltoznog sirupa (Maltozni sirup 40, A.D. Industrija skroba „Jabuka“, Pančevo, Srbija). Davanje maltoznog sirupa vršeno je svakodnevno, u isto vrijeme kao kod junica ogledne grupe.

Realizaciju istraživanja odobrio je Etički komitet Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, u skladu sa odredbama Zakona o dobrobiti životinja Republike Srbije (Službeni glasnik Republike Srbije 41/09).

Tabela 4.1. Vrsta i količina hraniva u obroku ispitivanih junica

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

Tabela 4.2. Hemijski sastav i nutritivna vrijednost obroka ispitivanih junica

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

## **4.2. Metode rada**

### **4.2.1. Uzimanje uzoraka krvi**

Uzimanje uzoraka krvi izvršeno je punkcijom *v. jugularis*, neposredno prije početka oglada (20 dana prije očekivanog termina teljenja), 3 i 7 dana kasnije, svakodnevno tokom 5 dana prije i 5 dana nakon teljenja, a zatim 7., 15., 30. i 60. dana nakon teljenja. Kako bi se izbjegao uticaj dnevnog ritma i uzimanja obroka na rezultate analiza, uzorkovanje je vršeno uvijek u isto vrijeme, 4 do 6 sati nakon jutarnjeg hranjenja, odmah nakon davanja PTU.

Uzorci su uzimani u sterilne vakuaenere bez antikoagulansa. Nakon uzimanja, uzorci krvi su ostavljani tokom 30 minuta da bi se izvršila spontana koagulacija, a zatim centrifugirani na 1,000 g tokom 20 minuta. Izdvojeni uzorci krvnih seruma su zamrzavani na -18°C do izvođenja analiza, koje su izvedene najkasnije dva mjeseca od uzorkovanja krvi.

### **4.2.2. Uzimanje uzoraka tkiva jetre**

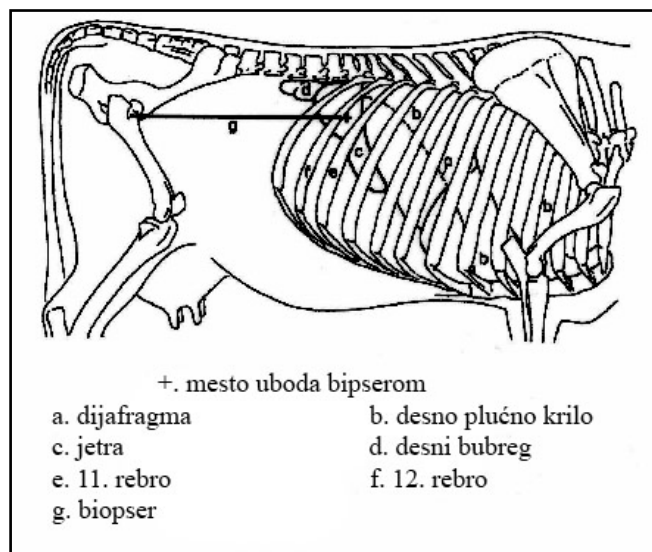
Uzorci tkiva jetre uzeti su perkutanom biopsijom za uzimanje uzoraka tkiva jetre za patohistološka ispitivanja, prema metodi koju su opisali Šamanc i saradnici (2010, 2011), od svih ispitanih životinja 7. dana prije očekivanog termina teljenja i 7. dana nakon teljenja.

Biopsija je vršena pomoću modifikovanog biopsera za uzimanje uzoraka tkiva jetre koji se sastojao od igle sa vrhom u obliku bodeža duge 20,5 cm, umetnute u čeličnu kanilu (spoljašnji promjer  $\varnothing$  6 mm, unutrašnji promjer  $\varnothing$  4 mm). Pribor za izvođenje biopsije, pored opisanog biopsera, sastojao se od brijača, rastvora povidon-jodida, 2% rastvora prokain-hidrohlorida, skalpela i plastične brizgalice sa klipom (slika 4.1.).



**Slika 4.1.** Pribor za izvođenje biopsije jetre (Kirovski, 2010)

Mjesto vršenja biopsije nalazilo se sa desne strane životinje, u 11. međurebarnom prostoru, oko 2 cm ventralno od horizontalne linije kroz *tuber coxae* (slika 4.2). Nakon fiksacije životinje i pripreme operacionog polja približne veličine 5 x 5 cm (šišanje, brijanje, dezinfekcija rastvorom povidon-jodida, lokalna infiltrativna anestezija sa 5 ml 2% prokain-hidrohlorida), načinjena je incizija kože i supkutisa skalpelom, a zatim su biopserom probijeni međurebarni mišići, peritoneum i kapsula jetre. Prilikom uvođenja biopser je usmjeren prema lijevom olekranonu (kranio-ventralno). Nakon ulaska u tkivo jetre, igla biopsera je izvađena, a na kanilu je postavljen plastična brizgalica koja povlačenjem klipa stvara vakuum. Uzorak tkiva jetre (dijametra 3-4 mm i dužine 3-5 cm) je uzet tako što je istovremeno sa povlačenjem klipa, instrument potiskivan dublje u tkivo jetre uz rotaciju od 180°, čime je isječak tkiva uvučen u lumen kanile. Nakon vađenja kanile sa isječkom tkiva jetre, rana na koži tretirana je antibiotskim praškom.



**Slika 4.2.** Šematski prikaz mjesta vršenja biopsije jetre (Kirovski, 2010)

Uzeti uzorci su po uzimanju podijeljeni na dva jednaka dijela, od kojih je jedan (za određivanje aktivnosti dejodinaza preko ekspresije iRNK) odmah duboko zamrzavan u tečnom azotu, a zatim čuvan na  $-80^{\circ}\text{C}$ , do izvođenja analiza. Drugi dio uzorka (za određivanje sadržaja masti i glikogena) konzervisan je u 10% puferizovanom rastvoru formalina i tako čuvan do izvođenja analiza.

#### **4.2.3. Određivanje količine proizvedenog mlijeka**

Mliječnost obje ispitane grupe junica registrovana je svakodnevno od 7. do 60. dana laktacije, prilikom redovne muže, uz pomoć automatskog mjerača aparata za mužu (DeLaval, Švedska).

#### **4.2.4. Određivanje trajanja servis perioda**

Trajanje servis perioda obje ispitane grupe junica određeno je na osnovu podataka sa farme, kao broj dana od teljenja do prvog uspješnog vještačkog osjemenjavanja. Uspješnost vještačkog osjemenjavanja je potvrđivana rektalnim pregledom 9-12 nedjelja nakon posljednjeg osjemenjavanja.

#### **4.2.5. Određivanje koncentracije odabranih biohemijskih parametara krvi**

U svim uzetim uzorcima krvi određivana je koncentracija glukoze. Koncentracije BHBA i ukupnog bilirubina su određivane u uzorcima uzetim 20., 17., 13., 7., 4. i 1.



dana prije teljenja kao i 1., 3., 5., 7., 15., 30. i 60. dana postpartalno. Koncentracije ukupnih proteina i albumina su određivane 20., 17., 13., 7. i 4. dana prije, na dan teljenja, kao i 3., 4., 7., 15., 30. i 60. dana postpartalno.

Koncentracije glukoze i beta-hidroksi butirata su određivane u punoj krvi odmah nakon uzimanja, na aparatu Precision Xceed (Abbott, SAD) upotrebom komercijalno dostupnih traka istog proizvođača. Ostali biohemijski parametri u uzorcima krvnih seruma određivani su na biohemijskom analizatoru Secomam CE, BP106 (Secomam, Francuska) kolorimetrijski i upotrebom enzimskih metoda korišćenjem komercijalnih test paketa (BioMedica, Srbija).

#### **4.2.6. Određivanje koncentracije hormona**

Koncentracije tireoidnih hormona i insulina određivane su u svim uzetim uzorcima krvi, dok je koncentracija IGF-I određivana u uzorcima uzetim 20., 17., 13., 7. i 4. dana prije i 7., 30. i 60. dana nakon teljenja. Koncentracije hormona određivane su upotrebom komercijalnih RIA kitova (INEP, Zemun), prilagođenih za detekciju koncentracije hormona u bovinom krvnom serumu, prema metodi koju su opisali Nikolić i saradnici (1996).

Na osnovu koncentracije glukoze i insulina za sve uzete uzorke krvi izračunat je HOMA indeks, kao pokazatelj insulinske rezistencije, odnosno osjetljivosti perifernih tkiva na insulin. Vrijednost HOMA indeksa određivana je računski, na osnovu formule:

$$\text{HOMA} - \text{IR} = \frac{\text{koncentracija glukoze (mmol/L)} \times \text{koncentracija insulina (mmol/L)}}{22,5}$$

#### **4.2.7. Određivanje relativne zastupljenosti IGF-vezujućih proteina**

Stepen relativne zastupljenosti IGF-vezujućih proteina (IGFBP-2, IGFBP -3 i IGFBP -4) određen je primjenom imunoblot metode u po šest odabranih uzoraka krvnih seruma iz svake grupe junica uzetih 20. i 7. dana prije i 7. i 30. dana nakon teljenja.

Kao priprema za određivanje stepena relativne zastupljenosti IGF-vezujućih proteina, uzorci krvnih seruma su prvo podvrgnuti elektroforezi (SDS-PAGE, 12,5% gel), prema metodi koju su opisali Hossenlopp i saradnici (1986) i Nikolić i saradnici (1998). Uzorci su prvo razrijeđeni sa 0,05M PBS puferom (pH=7,4) u odnosu 1:50, a zatim puferom za uzorke (Tris-HCl pufer, pH=6,8 , 2% SDS i 10% glicerol) u odnosu

1:1. Tako pripremljeni uzorci inkubirani su u vodenom kupatilu (56°C), tokom 7 minuta, kako bi se vezujući proteini izdvojili iz kompleksa sa molekulima IGF. Nakon toga sprovedena je elektroforeza (napon 60V, jačina struje 15mA) u trajanju od 17 sati. Kao markeri su korišćeni gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (36kDa), ovoalbumin (45kDa) i karboanhidraza (29 kDa).

Po završetku procesa elektroforeze, izdvojeni proteini krvnog seruma su elektrotransferom prenijeti na Imobilon-P membranu. Preostala slobodna mjesta na membrani su blokirana sa 3% deterdžentom Nonidet P40 u 0,01M Tris-HCl puferu (pH=7,4), koji je sadržavao 0,15 M NaCl kao osnovni pufer. Blokiranje slobodnih mjesta na membrani sprovedeno je na sobnoj temperaturi tokom jednog sata, uz redovno miješanje. Potom je membrana isprana sa 0,1% rastvorom Tween-20 u osnovnom puferu, tokom pola sata na sobnoj temperaturi. Ispiranje je potom sprovedeno u osnovnom puferu pod identičnim uslovima još četiri puta, u trajanju od po pet minuta. Tako pripremljene membrane čuvane su na temperaturi od -20°C, u trajanju od najviše tri mjeseca.

Određivanje prisustva i reaktivnosti IGF vezujućih proteina izvršeno je imunoblot (ligand blot) metodom, a kao ligand je korišten <sup>125</sup>I-IGF-I, pripremljen prema proceduri koju su opisali Greenwood i saradnici (1963). Prisustvo različitih frakcija IGF-vezujućih proteina, kao i njihova relativna zastupljenost procjenjivani su na osnovi reakcije vezivanja sa navedenim ligandom, prema metodi koju su opisali Hossenlopp i saradnici (1986).

Membrane pripremljene na opisani način su tokom 24 sata inkubirane na temperaturi od 4°C u prisustvu liganda (<sup>125</sup>I-IGF-I) u 0,01 M Tris-HCl puferu (pH=7,4), koji je sadržavao 0,15 M NaCl kao osnovni pufer i 0,1% Tween-20 (5 x 10<sup>6</sup> cpm/membrani). Nakon inkubacije, membrane su ispirane po pet puta sa osnovnim puferom, pri čemu su prva dva ispiranja izvršena uz dodatak Tween-20 rastvora. Nakon sušenja na vazduhu, membrane su stavljene u kontakt sa rendgenskim filmom, kako bi se izvršila autoradiografija. Nakon ekspozicije (šest nedelja na temperaturi od -80°C), izvršeno je razvijanje i fiksiranje filma upotrebom komercijalnih reagensa (razvijanje tokom tri minuta, ispiranje u 1% rastvoru sirćetne kiseline tokom jednog minuta, fiksiranje 10 minuta i ispiranje vodom tokom 20 minuta). Film je osušen na vazduhu, a intenzitet zatamnjenja na autoradiogramu je određen denzitometrijski. Relativni

intenzitet zatamnjenja traka na očekivanim pozicijama za IGF-vezujuće proteine izražen je u ADU (Arbitrary Densitometric Units).

#### **4.2.8. Određivanje ekspresije iRNK za pojedine tipove dejodinaza u tkivu jetre**

Ekspresija iRNK za pojedine tipove dejodinaza u tkivu jetre određivana je PCR metodom, nakon ekstrakcije RNK i reverzne transkripcije.

Ukupna količina RNK iz PFC izolovana je korištenjem TRIzol reagensa (Invitrogen, Life Technologies, SAD). Tkivo je izmjereno i homogenizovano u reagensu u omjeru 1 ml reagensu na 100 mg tkiva, uz pomoć Potter-Elvehjem staklo-teflonskog homogenizatora. Homogenati su zatim inkubirani na temperaturi od 30°C tokom 5 minuta, a zatim im je dodato 0,2 ml hloroforma. Nakon toga, homogenat je intenzivno miješan 15 sekundi, te inkubiran 3 minute na temperaturi od 30°C. Uzorci su zatim centrifugirani na 12,000 g tokom 15 minuta na temperaturi od 4°C. Vodena faza, koja je sadržala izolovanu RNK, je potom pomiješana sa 0,5 ml izopropanola, inkubirana na 3°C tokom 10 minuta, a onda centrifugirana na 12,000 g tokom 10 minuta na 4°C. Dobijena peleta RNK je resuspendovana u 75% etanolu, centrifugirana (7,500 g, tokom 5 minuta na 4°C), osušena na vazduhu, a zatim rastvorena u 100 µl 0,1% DEPC vode. Za sintezu cDNK korišten je cDNK reverzni transkripcioni kit visokog kapaciteta (Applied Biosystems, Life Technologies, SAD). Preciznije, 2 µg ukupne RNK su reverzno transkribovana uz pomoć MultiScribe reverzne transkriptaze (50 U/µl), u prisustvu 2 µl Random Prajmera, 0,8 µl 100 mM dNTP Mix, 1 µl RN-aza inhibitora i 10xRT pufera u ukupnoj količini od 20 µl. Dobijene cDNK su potom čuvane na -20°C.

Specifični prajmeri, prikazani u Tabeli 4.3.1., kreirani su da selektivno umnože iRNK za DIO1, DIO2, DIO3 i ATP5B, subjedinicu mitohondrijalne ATP sintetaze, korištene kao ciljni gen. Za svaki set prajmera sprovedeni su kontrolni eksperimenti, kako bi se definisao linearni raspon za PCR umnožavanje. Kao dodatne kontrole, za svaku reakciju su sprovedene i slijepe PCR probe, bez uzoraka.

Lista prajmera upotrebljenih u PCR reakciji data je u tabeli 4.3.1.

**Tabela 4.3.1.** Lista prajmera upotrebljenih u PCR reakciji

Ime	Orijentacija	Prajmer sekvenca	Veličina (bp)	Reference
DIO1	For	5'-ggt tcc gta gca gat ttt ctc atc-3'	273	Myers i saradnici, 2008
	Rev	5'-ggt cca agg acc agg ttt acc c-3'		
DIO2	For	5'-cca cct tct gga ctt tgc ca-3'	134	Capuco i saradnici, 2008
	Rev	5'-gga agt cag cca cgg atg ag-3'		
DIO3	For	5'-tca ctc cct gag gct ctg-3'	120	Capuco i saradnici, 2008
	Rev	5'-ccc agt aaa tgc tta cgg atg-3'		
ATP5B	For	5'-cat cgt ggc ggt cat tgg-3'	148	Do Amaral i saradnici, 2010
	Rev	5'-aat ggt cct tac tgt gct ctc-3'		

Za izvođenje reakcije, odgovarajuća razrjeđenja uzoraka cDNK su pomiješana sa PCR puferom koji je sadržao 0,2 mM dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 μM prajmera za DIO1, DIO2, DIO3 i ATP5B, 2 jedinice Taq polimeraze u ukupnoj zapremini od 25 μl. cDNK su umnožene u Eppendorf Mastercycler u 28 ciklusa u sljedećim uslovima: denaturacija 94°C/45 s; hlađenje 55°C/1 min (DIO1, DIO2), 61°C/1 min (DIO3) odnosno 58°C/1 min (ATP5B); ekstenzija 72°C/1 min; finalna ekstenzija 72°C/8 min. PCR proizvodi su potom podvrgnuti elektroforezi na 2% agarozu gelu zajedno sa MassRuler Low Range DNA Ladder, 50-1500 bp (Fermentas, SAD), i vizualizovani pod UV svjetlosti uz pomoć etidijum bromida. Intenzitet PCR proizvoda mjeren je fluorescentnom digitizacijom uz pomoć aparata GelDoc 1000 (BioRad, Hercules, CA). Kvantifikacija RT-PCR produkata izvršena je denzitometrijski, uz pomoć ImageJ softvera (National Institutes of Health, SAD), a intenzitet dobijenih traka je izražen u arbitrarnim jedinicama (Arbitrary Unit, AU). Arbitrarne jedinice za produkte amplifikacije DIO1, DIO2 i DIO3 su podijeljene prema produktu amplifikacije gena ATP5B upotrebljenog u istoj PCR reakciji. Za svaki gen su urađene najmanje tri nezavisne analize.

#### 4.2.9. Određivanje stepena zamašćenja jetre i sadržaja glikogena u hepatocitima

Stepen zamašćenja jetre određivan je stereometrijskom metodom, na patohistološkim preparatima tkiva jetre uzetog biopsijom, bojenim toluidin plavim.

Dio isječka tkiva dobijen biopsijom jetre fiksiran je u 10 % neutralnom puferisanom formalinu. Nakon toga tkivo je tretirano u automatskom tkivnom procesoru (Leica, Njemačka) pri čemu je izvršena dehidracija i impregnacija tkiva u parafinu. Nakon kalupljenja u parafinu, tkivo je uz pomoć mikrotoma isječeno na listiće debljine 5 µm, koji su potom obojeni toluidin plavim. Količina masti u hepatocitima je određivana stereometrijski, izračunavanjem volumenske gustine prema formuli:

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

gdje je:

$V_{vf}$  – volumenska gustina faze;

$P_f$  – tačke koje padaju na fazu;

$P_t$  – tačke testnog sistema.

Za brojanje je korišćena mrežica M 100 (Weibel, 1979).

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

Histološki preparati su bojeni PAS (Periodic Acid Schiff) metodom za određivanje sadržaja glikogena u uzorcima tkiva. Količina glikogena je ocjenjivana semikvantitativno. Kada je hepatocit potpuno ispunjen zrcima glikogena, takav nalaz je označen sa +++ . Smanjenje glikogena za 50 % označeno je sa ++, dok je smanjenje sadržaja glikogena u hepatocitima od preko 50 % označeno sa +. Nalaz glikogena u tragovima ili njegov potpun nedostatak u hepatocitima označen sa -.

#### **4.2.10. Statistička obrada podataka**

Statistička obrada podataka izvršena je uz pomoć softverskog paketa STATISTICA 6 (StatSoft, SAD). Rezultati istraživanja prikazani su uz pomoć parametara deskriptivne statistike, tabelarno i grafički. Statistička značajnost razlika vrijednosti ispitivanih parametara ( $p$ ) između ogledne i kontrolne grupe junica testirana je uz pomoć Studentovog “ $t$ ” testa. Kao statistički značajne uzete su razlike na nivou od  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  i  $p < 0,001$ .

## 5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Rezultati istraživanja prikazani su odvojeno za svaki ispitivani parametar.

### 5.1. Koncentracija trijodtironina (T<sub>3</sub>) u krvnom serumu junica

Koncentracija T<sub>3</sub> u krvnom serumu junica kontrolne i ogledne grupe, kao i statistička značajnost razlika u koncentracijama između kontrolne i ogledne grupe prikazane su u tabeli 5.1.1.

**Tabela 5.1.1.** Koncentracija T<sub>3</sub> (mmol/L) u krvnom serumu junica kontrolne i ogledne grupe izražena kao  $\bar{X} \pm SD$  uz prikaz statističke značajnosti razlika

Dan u odnosu na teljenje	Koncentracija T <sub>3</sub> (mmol/L)		Značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
-20.	2,46 ± 0,47	2,37 ± 0,43	NZ
-17.	2,42 ± 0,32	1,94 ± 0,17	p < 0,001
-13.	2,43 ± 0,24	1,59 ± 0,29	p < 0,001
-7.	2,44 ± 0,22	1,81 ± 0,37	p < 0,001
-4.	2,44 ± 0,27	1,91 ± 0,57	p < 0,01
-3.	2,44 ± 0,27	1,74 ± 0,44	p < 0,001
-2.	2,32 ± 0,21	1,72 ± 0,51	p < 0,01
-1.	2,31 ± 0,23	1,70 ± 0,43	p < 0,001
0 (dan teljenja)	2,27 ± 0,49	2,13 ± 0,49	NZ
+1.	1,15 ± 0,38	1,67 ± 0,41	p < 0,01
+2.	1,11 ± 0,39	1,51 ± 0,30	p < 0,01
+3.	1,22 ± 0,43	2,21 ± 0,88	p < 0,001
+4.	1,20 ± 0,29	1,81 ± 0,45	p < 0,001
+5.	1,20 ± 0,32	1,30 ± 0,21	NZ
+7.	1,50 ± 0,33	1,19 ± 0,35	p < 0,05
+15.	1,58 ± 0,15	1,37 ± 0,24	p < 0,01
+30.	1,99 ± 0,65	1,70 ± 0,54	NZ
+60.	2,12 ± 0,63	1,80 ± 0,54	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna

Podaci prikazani u tabeli 5.1.1. ukazuju da se koncentracija  $T_3$  u krvnom serumu junica ogleadne i kontrolne grupe nije statistički značajno razlikovala 20. dana prije teljenja, odnosno na dan početka tretmana sa PTU. Počevši od trećeg dana tretmana sa PTU, pa sve do dana teljenja odnosno prestanka tretmana, koncentracija  $T_3$  je bila statistički značajno niža kod junica ogleadne u odnosu na kontrolnu grupu. Na dan teljenja, koncentracija  $T_3$  je takođe bila niža kod junica ogleadne u odnosu na kontrolnu grupu, iako ova razlika nije bila statistički značajna. Važno je naglasiti da je koncentracija  $T_3$  u krvnom serumu junica ogleadne grupe u prvih pet dana nakon teljenja bila viša u odnosu na kontrolnu grupu junica, pri čemu je ta razlika tokom prva četiri dana bila statistički značajna. Sedmog i 15. dana nakon teljenja kod junica ogleadne grupe ustanovljena je statistički značajno niža koncentracija  $T_3$  u odnosu na junice kontrolne grupe. U uzorcima uzetim 30. i 60. dana nakon teljenja nisu ustanovljene statistički značajne razlike u koncentraciji  $T_3$  između junica ogleadne i kontrolne grupe, iako je njena vrijednost u oba perioda ispitivanja bila niža kod junica ogleadne grupe.

U tabeli 5.1.2. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija  $T_3$  utvrđenih u različitim periodima ispitivanja unutar kontrolne grupe junica.







## 5.2. Koncentracija tiroksina (T<sub>4</sub>) u krvnom serumu junica

Koncentracija T<sub>4</sub> u krvnom serumu junica kontrolne i ogledne grupe, kao i statistička značajnost razlika u koncentracijama između kontrolne i ogledne grupe prikazane su u tabeli 5.1.2.

**Tabela 5.2.1.** Koncentracija T<sub>4</sub> (mmol/L) u krvnom serumu junica kontrolne i ogledne grupe izražena kao  $\bar{X} \pm SD$ , uz prikaz statističke značajnosti razlika

Dan u odnosu na teljenje	Koncentracija T <sub>4</sub> (mmol/L)		Značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
-20.	122,60 ± 27,11	122,93 ± 18,03	NZ
-17.	115,67 ± 18,23	82,67 ± 3,35	p < 0,001
-13.	107,80 ± 18,46	66,00 ± 8,02	p < 0,001
-7.	91,80 ± 13,36	54,40 ± 15,32	p < 0,001
-4.	92,07 ± 13,26	48,73 ± 14,72	p < 0,001
-3.	87,07 ± 10,92	52,53 ± 14,62	p < 0,001
-2.	87,73 ± 13,26	51,73 ± 14,97	p < 0,001
-1.	95,20 ± 18,86	51,20 ± 18,23	p < 0,001
0 (dan teljenja)	89,46 ± 16,55	44,53 ± 17,88	p < 0,001
+1.	55,13 ± 11,91	42,13 ± 8,84	p < 0,01
+2.	47,87 ± 7,09	59,40 ± 10,73	p < 0,01
+3.	43,00 ± 5,23	69,47 ± 14,41	p < 0,001
+4 .	42,00 ± 15,29	54,26 ± 11,27	p < 0,05
+5.	55,00 ± 15,56	54,07 ± 9,16	NZ
+7.	60,20 ± 14,68	54,73 ± 11,92	NZ
+15.	69,27 ± 7,60	67,07 ± 2,52	NZ
+30.	70,20 ± 15,25	81,53 ± 11,64	p < 0,01
+60.	70,00 ± 12,36	82,27 ± 12,92	p < 0,05

NZ – razlika nije statistički značajna

Iz tabele 5.2.1 se zapaža da se koncentracija T<sub>4</sub> u krvnom serumu ispitanih grupa junica nije statistički značajno razlikovala 20. dana prije teljenja. Počevši od trećeg dana nakon početka tretmana sa PTU, odnosno od 17. dana prije teljenja, kod

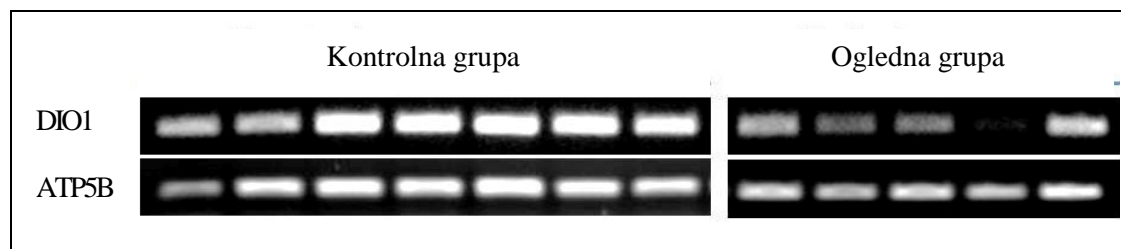




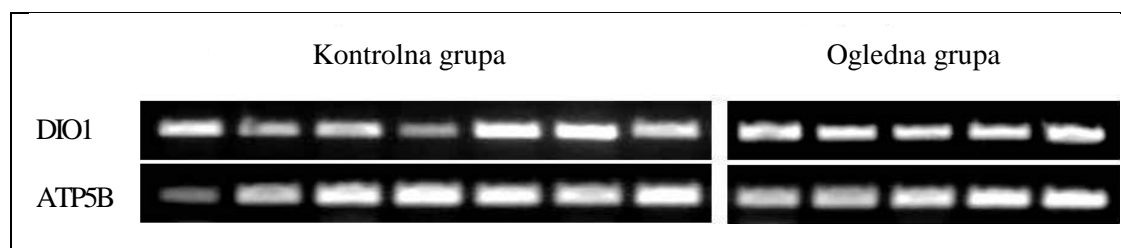
nakon teljenja koncentracija  $T_4$  se povećavala do kraja ispitivanog perioda, pri čemu je koncentracija ustanovljena 15., 30. i 60. dana nakon teljenja bila statistički značajno viša u odnosu na vrijednost ustanovljenu 5. dana nakon teljenja.

### 5.3. Ekspresija iRNK za pojedine tipove dejodinaza u uzorcima tkiva jetre

Na slici 5.3.1. prikazana je ekspresija iRNK za DIO1 u uzorcima tkiva jetre junica kontrolne i ogledne grupe 7. dana prije teljenja a na slici 5.3.2. ekspresija iRNK za DIO1 u uzorcima tkiva jetre ogledne i kontrolne grupe junica 7. dana nakon teljenja. Prikaz je izvršen zajedno sa ATP5B, proteinom koji je korišćen kao standard.



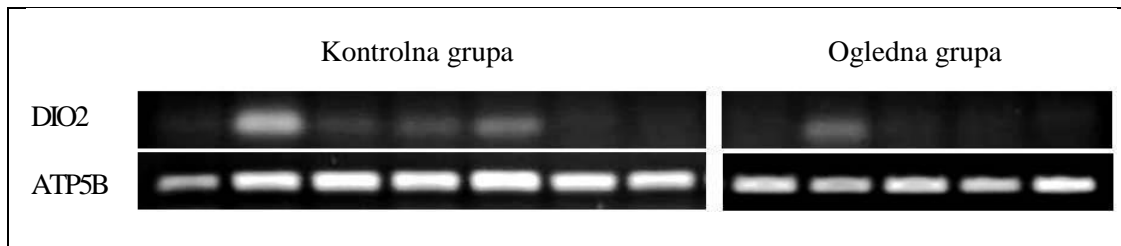
*Slika 5.3.1.* Ekspresija iRNK za DIO1 u uzorcima tkiva jetre kontrolne i ogledne grupe junica 7. dana prije teljenja



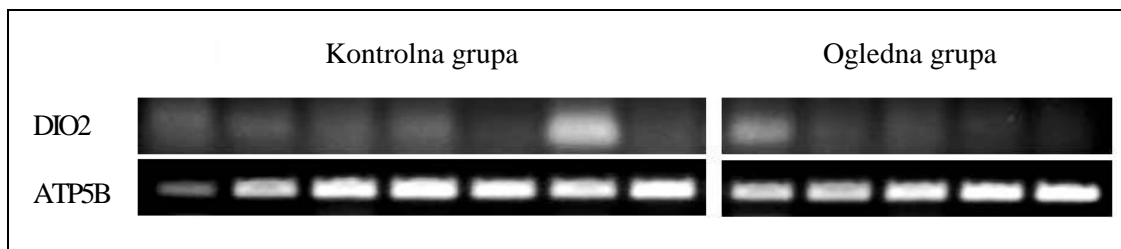
*Slika 5.3.2.* Ekspresija iRNK za DIO1 u uzorcima tkiva jetre kontrolne i ogledne grupe junica 7. dana nakon teljenja

Na slikama 5.3.1. i 5.3.2 se zapaža da je ekspresija iRNK za DIO1 u odabranim uzorcima tkiva jetre uzetim 7. dana prije i 7. nakon teljenja postojala i kod ogledne i kod kontrolne grupe junica.

Na slici 5.3.3. prikazana je ekspresija iRNK za DIO2 u uzorcima tkiva jetre junica kontrolne i ogledne grupe 7. dana prije teljenja, a na slici 5.3.4. ekspresija iRNK za DIO2 u uzorcima tkiva jetre junica kontrolne i ogledne grupe 7. dana nakon teljenja. Prikaz je izvršen zajedno sa ATP5B, proteinom koji je korišćen kao standard.



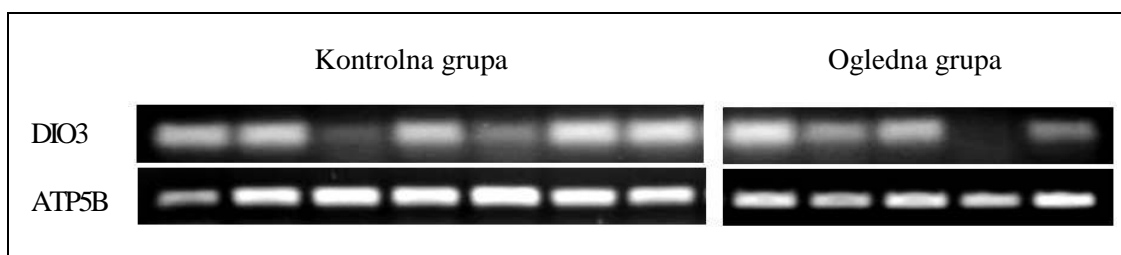
**Slika 5.3.3.** Ekspresija iRNK za DIO2 u uzorcima tkiva jetre kontrolne i ogledne grupe junica 7. dana prije teljenja



**Slika 5.3.4.** Ekspresija iRNK za DIO2 u uzorcima tkiva jetre kontrolne i ogledne grupe junica 7. dana nakon teljenja

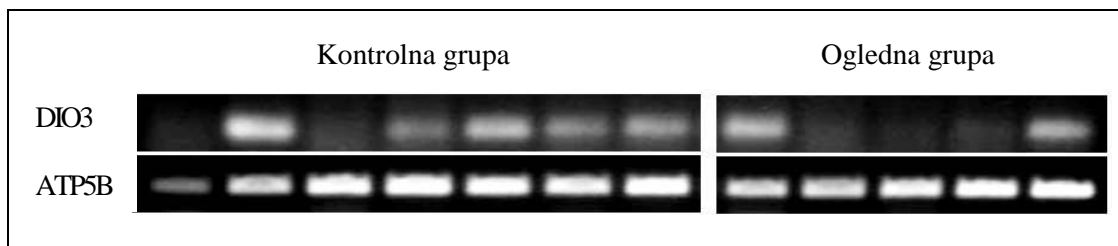
Na slikama 5.3.3. i 5.3.4. se zapaža da iRNK za DIO2 nije bila eksprimirana u uzorcima tkiva jetre ogledne i kontrolne grupe junica uzetim 7. dana prije i 7. dana nakon teljenja.

Na slici 5.3.5. prikazana je ekspresija iRNK za DIO3 u uzorcima tkiva jetre junica kontrolne i ogledne grupe 7. dana prije teljenja, a na slici 5.3.6. ekspresija iRNK za DIO3 u uzorcima tkiva jetre ogledne i kontrolne grupe junica 7. dana nakon teljenja. Prikaz je izvršen zajedno sa ATP5B, proteinom koji je korišćen kao standard.



**Slika 5.3.5.** Ekspresija iRNK za DIO3 u uzorcima tkiva jetre kontrolne i ogledne grupe junica 7. dana prije teljenja





**Slika 5.3.6.** Ekspresija iRNK za DIO3 u uzorcima tkiva jetre kontrolne i ogledne grupe junica 7. dana nakon teljenja

Na slikama 5.3.5. i 5.3.6. se zapaža da je ekspresija iRNK za DIO3 u uzorcima tkiva jetre ogledne i kontrolne grupe junica uzetim 7. dana prije i 7. dana nakon teljenja detektovana u tragovima.

U tabeli 5.3.1. prikazane su vrijednosti za ekspresiju iRNK za DIO1 u uzorcima tkiva jetre kontrolne i ogledne grupe junica, izražene u denzitometrijskim jedinicama (AU).

**Tabela 5.3.1.** Ekspresija iRNK za DIO1 u uzorcima tkiva jetre kontrolne i ogledne grupe junica izražena kao  $\bar{X} \pm SD$ , uz prikaz statističke značajnosti razlika

Dan u odnosu na teljenje	DIO1 (AU)		Značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
-7.	1,36 ± 0,82 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,15 <sup>b</sup>	P < 0,05
+7.	1,20 ± 0,58 <sup>a</sup>	1,17 ± 0,19 <sup>a,c</sup>	NZ

NZ - razlika nije statistički značajna;; a, b, c, d – različita slova ukazuju na statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) između vrijednosti prikazanih u tabeli

Podaci prikazani u tabeli 5.3.1. ukazuju da je prepartalna ekspresija iRNK za DIO1 u uzorcima tkiva jetre bila statistički značajno niža kod ogledne u odnosu na kontrolnu grupu, dok postpartalno ta razlika nije ustanovljena. Kod ogledne grupe junica je postpartalno došlo do statistički značajnog porasta ekspresije iRNK za DIO1 u odnosu na vrijednost ustanovljenu prepartalno, dok je kod kontrolne grupe u istom periodu došlo do smanjenja, koje nije bilo statistički značajno. Takođe, prepartalna ekspresija iRNK za DIO1 u uzorcima tkiva jetre ogledne grupe je bila najniža, odnosno statistički značajno niža nego u svim ostalim periodima ispitivanja u obje grupe.

U tabeli 5.3.2. prikazane su vrijednosti za ekspresiju iRNK za DIO3 u uzorcima tkiva jetre kontrolne i ogledne grupe junica izražene u denzitometrijskim jedinicama (AU).

**Tabela 5.3.2** Ekspresija iRNK za DIO3 u uzorcima tkiva jetre kontrolne i ogledne grupe junica izražena kao  $\bar{X} \pm SD$ , uz prikaz statističke značajnosti razlika

Dan u odnosu na teljenje	DIO3 (AU)		Značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
-7.	0,77 ± 0,28 <sup>a</sup>	0,66 ± 0,18 <sup>a</sup>	NZ
+7.	0,85 ± 0,59 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,39 <sup>a</sup>	NZ

NZ - razlika nije statistički značajna;; a, b, c, d – različita slova ukazuju na statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) između vrijednosti prikazanih u tabeli

Podaci prikazani u tabeli 5.3.2. ukazuju da je ekspresija iRNK za DIO3 u uzorcima tkiva jetre bila niža kod ogledne grupe junica u odnosu na kontrolnu grupu, kako prepartalno tako i postpartalno, ali ovo smanjenje nije bilo statistički značajno.

Posmatrano u odnosu na period uzorkovanja, nisu ustanovljene statistički značajne razlike u ekspresiji iRNK za DIO3 unutar ispitivanih grupa junica. Iz prikazanih podataka uočljiv je suprotan trend kretanja aktivnosti DIO 3 kod ispitanih grupa junica, jer je kod ogledne grupe ustanovljeno njeno opadanje, a kod kontrolne njen porast.

U tabeli 5.3.3. prikazan je odnos ekspresija iRNK za DIO1 i DIO3 u uzorcima tkiva jetre kontrolne i ogledne grupe junica.

**Tabela 5.3.3.** Odnos aktivnosti ekspresija iRNK za DIO1 i DIO3 u uzorcima tkiva jetre kontrolne i ogledne grupe junica

Dan u odnosu na teljenje	DIO1/DIO3		Značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
-7.	1,90 ± 1,09 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,28 <sup>b</sup>	P < 0,05
+7.	1,75 ± 1,03 <sup>a</sup>	3,03 ± 1,53 <sup>a</sup>	NZ

NZ - razlika nije statistički značajna;; a, b, c, d – različita slova ukazuju na statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) između vrijednosti prikazanih u tabeli

Podaci prikazani u tabeli 5.3.3. ukazuju da je odnos ekspresija iRNK za DIO1 i DIO3 (DIO1/DIO3) u uzorcima tkiva jetre uzetim prepartalno bio statistički značajno niži kod ogleđne u odnosu na kontrolnu grupu. U uzorcima uzetim postpartalno nije ustanovljena statistički značajna razlika u odnosu ekspresija iRNK za DIO1 i DIO3, ali je taj odnos bio viši kod junica ogleđne grupe.

Posmatrano u odnosu na period uzorkovanja, nisu ustanovljene statistički značajne razlike u odnosu ekspresija iRNK za DIO1 i DIO3 unutar kontrolne grupe junica, dok je kod ogleđne grupe junica ustanovljeno da je prepartalni odnos ekspresija iRNK za DIO1 i DIO3 bio statistički značajno niži u odnosu na vrijednosti ustanovljene postpartalno. Iz prikazanih podataka uočljiv je suprotan trend kretanja odnosa ekspresija iRNK za DIO1 i DIO3 kod ispitanih grupa junica, jer je kod ogleđne grupe junica ustanovljen njegov porast, a kod kontrolne njegovo opadanje.

#### 5.4. Koncentracija insulina u krvnom serumu junica

Koncentracija insulina u krvnom serumu junica kontrolne i ogledne grupe, kao i statistička značajnost razlika u koncentracijama između kontrolne i ogledne grupe prikazane su u tabeli 5.4.1.

**Tabela 5.4.1** Koncentracija insulina ( $\mu\text{IU/L}$ ) u krvnom serumu junica kontrolne i ogledne grupe izražena kao  $\bar{X} \pm \text{SD}$ , uz prikaz statističke značajnosti razlika

Dan u odnosu na teljenje	Koncentracija insulina ( $\mu\text{IU/L}$ )		Značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
-20.	16,15 $\pm$ 1,03	16,46 $\pm$ 3,30	NZ
-17.	16,34 $\pm$ 2,44	19,58 $\pm$ 1,55	p < 0,001
-13.	17,05 $\pm$ 2,99	21,00 $\pm$ 2,54	p < 0,001
-7.	17,10 $\pm$ 5,18	20,59 $\pm$ 2,99	p < 0,01
-4.	17,29 $\pm$ 3,92	20,45 $\pm$ 3,00	p < 0,05
-3.	17,32 $\pm$ 3,95	21,92 $\pm$ 6,63	p < 0,05
-2.	17,43 $\pm$ 3,84	25,36 $\pm$ 7,01	p < 0,001
-1.	17,98 $\pm$ 2,93	26,54 $\pm$ 9,37	p < 0,01
0 (dan teljenja)	27,05 $\pm$ 8,89	32,63 $\pm$ 7,93	NZ
+1.	13,56 $\pm$ 4,54	20,61 $\pm$ 10,44	p < 0,01
+2.	11,03 $\pm$ 2,61	17,09 $\pm$ 4,58	p < 0,001
+3.	10,27 $\pm$ 3,23	13,07 $\pm$ 4,88	NZ
+4.	9,55 $\pm$ 2,38	10,01 $\pm$ 2,43	NZ
+5.	11,03 $\pm$ 1,34	11,73 $\pm$ 2,24	NZ
+7.	11,55 $\pm$ 3,28	13,39 $\pm$ 2,70	NZ
+15.	11,83 $\pm$ 3,50	13,54 $\pm$ 2,14	NZ
+30.	12,74 $\pm$ 1,40	14,94 $\pm$ 7,54	NZ
+60.	13,40 $\pm$ 1,37	15,67 $\pm$ 7,37	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna

Iz tabele 5.4.1. se zapaža da se koncentracija insulina u krvnom serumu između ispitanih grupa junica nije razlikovala na početku ogleda. Odmah nakon početka tretmana sa PTU, odnosno počevši od 17. dana do 1. dana prije teljenja



U tabeli 5.4.3. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija insulina ustanovljenih u različitim periodima ispitivanja unutar ogledne grupe junica.

**Tabela 5.4.3.** Statistička značajnost razlika između koncentracija insulina ustanovljenih u različitim periodima ispitivanja unutar ogledne grupe junica

Dan AP/PP	-20.																				
-17.	**	-17.																			
-13.	**	NZ	-13.																		
-7.	*	NZ	NZ	-7.																	
-4.	*	NZ	NZ	NZ	-4.																
-3.	*	NZ	NZ	NZ	NZ	-3.															
-2.	**	**	*	*	*	NZ	-2.														
-1.	***	*	*	*	*	NZ	NZ	-1.													
<b>Partus</b>	***	***	***	***	***	**	**	NZ	<b>Partus</b>												
+1.	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	**	**	+1.											
+2.	NZ	NZ	**	*	*	NZ	***	**	***	NZ	+2.										
+3.	*	***	***	***	***	**	***	***	***	*	*	+3.									
+4.	***	***	***	***	***	***	***	***	***	**	***	NZ	+4.								
+5.	***	***	***	***	***	***	***	***	***	**	***	NZ	*	+5.							
+7.	*	***	***	***	***	***	***	***	***	*	*	NZ	**	NZ	+7.						
+15.	*	***	***	***	***	***	***	***	***	*	**	NZ	**	NZ	NZ	+15.					
+30.	NZ	*	*	**	*	*	**	**	***	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	+30.				
+60.	NZ	*	*	**	*	*	**	*	***	NZ	NZ	NZ	*	NZ	NZ	NZ	**				

NZ – razlika nije statistički značajna; \*\*\* p<0,001; \*\* p<0,01; \* p<0,05

Koncentracija insulina se statistički značajno povećala odmah nakon tretmana, tako da je u svim uzorcima krvi uzetim prepartalno bila statistički značajno viša nego prije početka tretmana sa PTU. U momentu teljenja insulinemija je bila statistički značajno viša u odnosu na sve druge vrijednosti ustanovljene kako prepartalno, tako i postpartalno. Nakon teljenja, odnosno nakon prestanka tretmana sa PTU, koncentracija insulina se statistički značajno smanjila u odnosu na vrijednost ustanovljenu u momentu teljenja i do kraja ogleda je bila statistički značajno niža u odnosu na vrijednost ustanovljenu u momentu teljenja. Počevši od 3. dana nakon teljenja insulinemija je bila statistički značajno niža u odnosu na sve vrijednosti ustanovljene prepartalno.

## 5.5. Koncentracija glukoze u krvi junica

Koncentracija glukoze u krvi junica kontrolne i ogledne grupe kao i statistička značajnost razlika prikazana je u tabeli 5.5.1.

**Tabela 5.5.1.** Koncentracija glukoze (mmol/L) u krvi junica kontrolne i ogledne grupe, izražena kao  $\bar{X} \pm SD$ , uz prikaz statističke značajnosti razlika

Dan u odnosu na teljenje	Koncentracija glukoze (mmol/L)		Značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
-20.	3,57 ± 0,46	3,62 ± 0,44	NZ
-17.	3,63 ± 0,29	3,09 ± 0,33	p < 0,001
-13.	3,86 ± 0,55	4,09 ± 0,48	NZ
-7.	3,69 ± 0,36	3,87 ± 0,35	NZ
-4.	3,50 ± 0,44	3,60 ± 0,27	NZ
-3.	2,83 ± 0,39	3,09 ± 0,35	NZ
-2.	3,10 ± 0,28	3,39 ± 0,20	p < 0,01
-1.	3,53 ± 0,38	4,59 ± 1,14	p < 0,01
0 (dan teljenja)	3,55 ± 0,28	4,10 ± 0,26	p < 0,001
+1.	3,05 ± 0,39	4,30 ± 0,91	p < 0,001
+2.	3,09 ± 0,23	3,57 ± 0,29	p < 0,001
+3.	2,82 ± 0,33	2,66 ± 0,38	NZ
+4.	2,65 ± 0,23	2,62 ± 0,42	NZ
+5.	2,75 ± 0,28	2,83 ± 0,34	NZ
+7.	2,67 ± 0,38	2,90 ± 0,68	NZ
+15.	2,81 ± 0,30	3,02 ± 0,20	NZ
+30.	3,78 ± 0,50	3,39 ± 0,28	p < 0,05
+60.	3,78 ± 0,32	3,32 ± 0,18	p < 0,01

NZ – razlika nije statistički značajna

Iz tabele 5.5.1. zapaža se da se koncentracija glukoze u krvi ispitivanih grupa junica nije statistički značajno razlikovala 20. dana prije teljenja. Sedamnaestog dana prije teljenja glikemija je kod ogledne grupe bila statistički značajno niža nego kod kontrolne. Nakon toga, sve do 2. dana nakon teljenja, koncentracija glukoze je u krvi





niža od svih ostalih vrijednosti ustanovljenih tokom ispitivanog perioda. Od 2. dana prije teljenja do dana teljenja koncentracija glukoze je rasla, da bi se nakon teljenja smanjila i održavala na približno jednakom nivou, na šta ukazuje i izostanak statističke značajnosti razlika između vrijednosti postpartalne koncentracije glukoze sve do 30. dana nakon teljenja. Koncentracija glukoze u krvi junica kontrolne grupe ustanovljena 30. dana nakon teljenja dostigla je vrijednosti ustanovljene 13. dana dana prije teljenja, i bila je statistički značajno viša u odnosu na sve ostale vrijednosti ustanovljene postpartalno, sa izuzetkom vrijednosti ustanovljene 60. dana nakon teljenja. Šezdesetog dana nakon teljenja ustanovljena je koncentracija glukoze koja je bila statistički značajno viša u odnosu na sve vrijednosti ustanovljene u periodu od 3. dana prije do 15. dana nakon teljenja.

U tabeli 5.5.3. je prikazana statistička značajnost razlika između vrijednosti koncentracije glukoze utvrđenih u različitim periodima ispitivanja unutar ogledne grupe junica.



## 5.6. Koncentracija BHBA u krvi junica

Koncentracija BHBA u krvi junica kontrolne i ogledne grupe, kao i statistička značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe prikazana je u tabeli 5.6.1.

Tabela 5.6.1. Koncentracija BHBA (mmol/L) u krvi junica kontrolne i ogledne grupe, izražena kao  $\bar{X} \pm SD$ , uz prikaz statističke značajnosti razlika

Dan u odnosu na teljenje	Koncentracija BHBA (mmol/L)		Značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
-20.	0,38 ± 0,11	0,37 ± 0,08	NZ
-17.	0,41 ± 0,11	0,35 ± 0,11	NZ
-13.	0,53 ± 0,16	0,33 ± 0,10	p < 0,001
-7.	0,57 ± 0,17	0,25 ± 0,07	p < 0,001
-4.	0,58 ± 0,17	0,24 ± 0,14	p < 0,001
-1.	0,56 ± 0,11	0,43 ± 0,07	p < 0,001
+1.	0,76 ± 0,12	0,41 ± 0,14	p < 0,001
+3.	0,72 ± 0,14	0,67 ± 0,22	p < 0,05
+5.	1,27 ± 0,83	0,67 ± 0,33	p < 0,05
+7.	1,01 ± 0,56	0,87 ± 0,33	NZ
+15.	0,51 ± 0,26	0,88 ± 0,64	p < 0,05
+30.	0,24 ± 0,13	0,51 ± 0,20	p < 0,001
+60.	0,33 ± 0,10	0,55 ± 0,21	p < 0,001

NZ – razlika nije statistički značajna

Iz tabele 5.6.1. se zapaža da se koncentracija BHBA u krvi ispitivanih grupa junica nije statistički značajno razlikovala 20. i 17. dana prije teljenja. U periodu od 13. dana prije do 5. dana nakon teljenja kod junica kontrolne grupe ustanovljena je statistički značajno viša koncentracija BHBA u odnosu na junice ogledne grupe. Sedmog dana nakon teljenja koncentracije su izjednačene između ispitanih grupa junica, a nakon toga su junice ogledne grupe imale značajno višu koncentraciju BHBA.

U tabeli 5.6.2. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija BHBA ustanovljenih u različitim periodima ispitivanja unutar kontrolne grupe junica.

**Tabela 5.6.2.** Statistička značajnost razlika između koncentracija BHBA ustanovljenih u različitim periodima ispitivanja unutar kontrolne grupe junica

Dan AP/PP	-20.												
-17.	NZ	-17.											
-13.	*	*	-13.										
-7.	***	***	NZ	-7.									
-4.	**	*	NZ	NZ	-4.								
-1.	***	**	NZ	NZ	NZ	-1.							
+1.	***	***	***	**	**	***	+1.						
+3.	***	***	**	*	*	**	NZ	+3.					
+5.	***	**	**	**	*	**	*	*	+5.				
+7.	***	***	**	*	*	**	NZ	NZ	NZ	+7.			
+15.	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	**	*	**	**	+15.		
+30.	**	**	***	***	***	***	***	***	***	***	**	+30.	
+60.	NZ	*	**	***	***	***	***	***	***	***	*	*	

NZ – razlika nije statistički značajna; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$

Koncentracija BHBA je kod junica kontrolne grupe postepeno rasla od 20. do 3. dana prije teljenja, kada je dostigla i najvišu prepartalnu vrijednost, da bi potom imala blagi trend opadanja prema danu teljenja. Koncentracija BHBA je 1. dana nakon teljenja porasla, ali je statistička značajnost razlika u odnosu na 3. i 1. dan prije teljenja izostala. Trećeg dana nakon teljenja koncentracija BHBA je blago opala u odnosu na 1. dan nakon teljenja, a zatim je 5. dana statistički značajno porasla i dostigla najvišu vrijednost ustanovljenu postpartalno i u toku cijelog perioda ispitivanja. Ova vrijednost je bila statistički značajno viša u odnosu na sve ostale vrijednosti ustanovljene kod junica kontrolne grupe tokom cijelog perioda ispitivanja. U periodu od 7. do 30. dana nakon teljenja, koncentracija BHBA je opadala, i 30. dana nakon teljenja dostigla najnižu vrijednost ustanovljenu tokom ispitivanog perioda. Ova vrijednost je bila statistički značajno niža u odnosu na sve ostale vrijednosti ustanovljene kod junica kontrolne grupe tokom cijelog perioda ispitivanja. Šezdesetog dana nakon teljenja došlo je do blagog porasta koncentracije BHBA u odnosu na prethodni period ispitivanja, pri čemu je ustanovljena vrijednost bila statistički značajno niža u odnosu na sve ostale vrijednosti, sa izuzetkom one ustanovljene na početku ogleđa.

U tabeli 5.6.3. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija BHBA ustanovljenih u različitim periodima ispitivanja unutar ogledne grupe junica.

**Tabela 5.6.3.** Statistička značajnost razlika između koncentracija BHBA ustanovljenih u različitim periodima ispitivanja unutar ogledne grupe junica

Dan AP/PP	-20.												
-17.	NZ	-17.											
-13.	NZ	NZ	-13.										
-7.	***	*	*	-7.									
-4.	*	*	NZ	NZ	-4.								
-1.	NZ	*	*	***	***	-1.							
+1.	NZ	NZ	NZ	**	**	NZ	+1.						
+3.	***	***	***	***	***	***	***	+3.					
+5.	**	**	**	***	***	*	*	NZ	+5.				
+7.	***	***	***	***	***	**	**	NZ	NZ	+7.			
+15.	**	**	**	**	**	*	**	NZ	NZ	NZ	+15.		
+30.	*	**	**	***	***	NZ	NZ	***	NZ	NZ	*	+30.	
+60.	**	**	***	***	***	*	NZ	*	NZ	NZ	NZ	NZ	

NZ – razlika nije statistički značajna; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$

Koncentracija BHBA je kod ogledne grupe junica imala trend opadanja od 20. do 3. dana prije teljenja, kada je ustanovljena i njena najniža vrijednost tokom ispitivanog perioda. Jedan dan prije i 1. dana nakon teljenja došlo je do statistički značajnog porasta prosječne koncentracije BHBA u odnosu na 3. dan prije teljenja. Prosječna koncentracija BHBA ustanovljena 3. dana nakon teljenja bila je viša u odnosu na vrijednosti ustanovljene 1. dana prije i 1. dana nakon teljenja, zatim je blago opala, pa nastavila da raste sve do 15. dana nakon teljenja, kada je ustanovljena najviša vrijednost u toku ispitivanog perioda. Od 15. dana nakon teljenja prema kraju ispitivanog perioda, koncentracija BHBA je imala trend opadanja, a ustanovljene vrijednosti su bile približno dvostruko veće u odnosu na one ustanovljene 3. dana prije teljenja.

## 5.7. Vrijednost HOMA indeksa u krvnom serumu junica

Vrijednost HOMA indeksa u krvnom serumu junica kontrolne i ogledne grupe, kao i statistička značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe prikazana je u tabeli 5.7.1.

**Tabela 5.7.1.** Vrijednost HOMA indeksa u krvnom serumu junica kontrolne i ogledne grupe, izražena kao  $\bar{X} \pm SD$ , uz prikaz statističke značajnosti razlika

Dan u odnosu na teljenje	HOMA indeks		Značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
-20.	2,56 ± 0,39	2,64 ± 0,58	NZ
-17.	2,63 ± 0,36	2,69 ± 0,40	NZ
-13.	2,95 ± 0,78	3,81 ± 0,58	p<0,01
-5.	2,82 ± 0,88	3,53 ± 0,57	p<0,05
-4.	2,70 ± 0,74	3,27 ± 0,48	p<0,05
-3.	2,18 ± 0,53	3,01 ± 0,93	p<0,01
-2.	2,40 ± 0,58	3,83 ± 1,12	p<0,001
-1.	2,84 ± 0,65	5,50 ± 2,76	p<0,001
0 (dan teljenja)	4,28 ± 1,56	5,94 ± 1,48	p<0,01
+1.	1,83 ± 0,68	3,83 ± 1,75	p<0,001
+2.	1,51 ± 0,34	2,72 ± 0,85	p<0,001
+3.	1,29 ± 0,44	1,76 ± 0,68	p<0,05
+4.	1,19 ± 0,30	1,30 ± 0,50	NZ
+5.	1,34 ± 0,19	1,47 ± 0,31	NZ
+7.	1,40 ± 0,53	1,59 ± 0,37	NZ
+15.	1,39 ± 0,42	1,57 ± 0,31	NZ
+30.	2,15 ± 0,42	2,28 ± 1,30	NZ
+60.	2,26 ± 0,34	2,31 ± 1,06	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna

Iz podataka prikazanih u tabeli 5.7.1. uočava se da se vrijednost HOMA indeksa kod junica ogledne i kontrolne grupe nije statistički značajno razlikovala 20. i 17. dana prije teljenja. U periodu od 13. dana prije do 3. dana nakon teljenja, vrijednost HOMA indeksa bila je statistički značajno viša kod ogledne u odnosu na







Vrijednost HOMA indeksa kod junica ogledne grupe je imala trend porasta u periodu od 20. do 13. dana prije teljenja, a zatim je postepeno opadala sve do 3. dana prije teljenja. Od 2. dana prije teljenja do dana teljenja ustanovljen je porast vrijednosti HOMA indeksa, a na dan teljenja je ustanovljena najviša vrijednost tokom ispitivanog perioda. Ova vrijednost je bila statistički značajno viša u odnosu na sve ostale vrijednosti ustanovljene tokom ispitivanog perioda, sa izuzetkom vrijednosti ustanovljene dan prije teljenja. Nakon teljenja, kao i kod junica kontrolne grupe, ustanovljeno je opadanje prosječne vrijednosti HOMA indeksa, a najniža vrijednost tokom ispitivanog perioda ustanovljena je 4. dana nakon teljenja. Ova vrijednost je bila statistički značajno niža u odnosu na sve ostale vrijednosti ustanovljene tokom cijelog perioda ispitivanja, sa izuzetkom vrijednosti ustanovljenih 5. i 15. dana nakon teljenja. Od 5. dana nakon teljenja prema kraju ispitivanog perioda ustanovljen je postepeni porast vrijednosti HOMA indeksa, a statistička značajnost razlika ustanovljena je u odnosu na 30. i 60. dan nakon teljenja.

## 5.8. Koncentracija IGF-I u krvnom serumu junica

Koncentracija IGF-I u krvnom serumu junica kontrolne i ogledne grupe, kao i statistička značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe prikazana je u tabeli 5.8.1.

**Tabela 5.8.1.** Koncentracija IGF-I (mmol/L) u krvnom serumu junica kontrolne i ogledne grupe izražena kao  $\bar{X} \pm SD$ , uz prikaz statističke značajnosti razlika

Dan u odnosu na teljenje	Koncentracija IGF (mmol/L)		Značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
-20.	26,87 ± 1,23	27,93 ± 3,95	NZ
-17.	23,15 ± 2,23	27,55 ± 1,80	p < 0,001
-13.	22,09 ± 1,52	24,49 ± 2,90	p < 0,01
-7.	18,43 ± 1,62	23,36 ± 1,43	p < 0,001
-4.	16,84 ± 3,31	21,04 ± 2,01	p < 0,001
+7.	11,73 ± 5,83	12,43 ± 1,68	NZ
+30.	14,19 ± 2,56	17,15 ± 4,49	p < 0,05
+60.	14,81 ± 2,59	19,85 ± 4,00	p < 0,001

NZ – razlika nije statistički značajna

Podaci prikazani u tabeli 5.8.1. ukazuju da se koncentracija IGF –I u krvnom serumu junica ogledne i kontrolne grupe 20. dana prije teljenja nije statistički značajno razlikovala. U periodu od 17. do 4. dana prije teljenja koncentracija IGF-I je bila statistički značajno viša kod junica ogledne u odnosu na junice kontrolne grupe. Koncentracija IGF-I je bila viša kod junica ogledne grupe i u uzorcima uzetim 7. dana nakon teljenja, iako nije ustanovljena statistički značajna razlika. Tridesetog i 60. dana nakon teljenja nastavljen je trend održavanja viših koncentracija IGF-I kod ogledne grupe junica u odnosu na kontrolnu, pri čemu je ustanovljeno da su te razlike bile statistički značajne.

U tabeli 5.8.2. je prikazana statistička značajnost razlika između koncentracija IGF-I ustanovljenih u različitim periodima ispitivanja unutar kontrolne grupe junica.

**Tabela 5.8.2.** Statistička značajnost razlika između koncentracija IGF-I ustanovljenih u različitim periodima ispitivanja unutar kontrolne grupe junica

<b>Dan AP/PP</b>	<b>-20.</b>						
<b>-17.</b>	***	<b>-17.</b>					
<b>-13.</b>	***	NZ	<b>-7.</b>				
<b>-7.</b>	***	***	***	<b>-5.</b>			
<b>-4.</b>	***	***	***	NZ	<b>-4.</b>		
<b>+7.</b>	***	***	***	***	*	<b>+7.</b>	
<b>+30.</b>	***	***	***	***	**	NZ	<b>+30.</b>
<b>+60.</b>	***	***	***	***	*	NZ	***

NZ – razlika nije statistički značajna; \*\*\* p<0,001; \*\* p<0,01; \* p<0,05

Najviša vrijednost koncentracije IGF-I u krvnom serumu junica kontrolne grupe ustanovljena je 20. dana prije teljenja. Ova vrijednost je bila statistički značajno viša u odnosu na sve ostale vrijednosti ustanovljene tokom ispitivanog perioda. Od 17. dana prije do 7. dana nakon teljenja koncentracija IGF-I je opadala, a najniža vrijednost u toku ispitivanog perioda je ustanovljena 7. dana nakon teljenja. Ova vrijednost je bila statistički značajno niža u odnosu na sve vrijednosti ustanovljene tokom ispitivanog perioda, sa izuzetkom vrijednosti ustanovljenih 30. i 60. dana nakon teljenja. Od 30. dana nakon teljenja prema kraju ispitivanog perioda ustanovljen je porast koncentracije IGF-I u odnosu na vrijednost ustanovljenu 7. dana nakon teljenja, iako nije ustanovljena statistički značajna razlika. Koncentracija IGF-I u krvnom serumu junica kontrolne grupe ustanovljena 60. dana nakon teljenja bila je statistički značajno viša u odnosu na vrijednost ustanovljenu 30. dana nakon teljenja.

U tabeli 5.8.3. je prikazana statistička značajnost razlika između koncentracija IGF-I ustanovljenih u različitim periodima ispitivanja unutar ogledne grupe junica.

**Tabela 5.8.3.** Statistička značajnost razlika između koncentracija IGF-I ustanovljenih u različitim periodima ispitivanja unutar ogledne grupe junica

<b>Dan AP/PP</b>	<b>-20.</b>						
<b>-17.</b>	NZ	<b>-17.</b>					
<b>-13.</b>	***	**	<b>-13.</b>				
<b>-5.</b>	**	***	NZ	<b>-5.</b>			
<b>-4.</b>	***	***	***	***	<b>-4.</b>		
<b>+7.</b>	***	***	***	***	***	<b>+7.</b>	
<b>+30.</b>	***	***	***	***	**	**	<b>+30.</b>
<b>+60.</b>	***	***	**	**	NZ	***	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna; \*\*\* p<0,001; \*\* p<0,01; \* p<0,05

Kao i kod kontrolne grupe junica, najviša vrijednost koncentracije IGF-I u krvnom serumu junica ogledne grupe ustanovljena je 20. dana prije teljenja. Ova vrijednost bila je statistički značajno viša u odnosu na sve ostale vrijednosti ustanovljene do kraja ispitivanog perioda, sa izuzetkom vrijednosti ustanovljene 17. dana prije teljenja. Od 17. dana prije do 7. dana nakon teljenja, koncentracija IGF-I je postepeno i statistički značajno opadala. Najniža vrijednost koncentracije IGF-I u krvnom serumu junica ogledne grupe ustanovljena je 7. dana nakon teljenja. Ova vrijednost je bila statistički značajno niža u odnosu na sve ostale vrijednosti ustanovljene tokom ispitivanog perioda. Od 30. dana prema kraju ispitivanog perioda ustanovljen je statistički značajan porast koncentracije IGF-I u odnosu na vrijednost ustanovljenu 7. dana nakon teljenja, dok između vrijednosti ustanovljenih 30. i 60. dana nakon teljenja nisu ustanovljene statistički značajne razlike.

## 5.9. Relativna zastupljenost IGF-vezujućih proteina u krvnom serumu junica

Relativna zastupljenost IGF-vezujućih proteina u krvnom serumu junica kontrolne i ogledne grupe prikazana je u tabelama 5.9.1., 5.9.2. i 5.9.3.

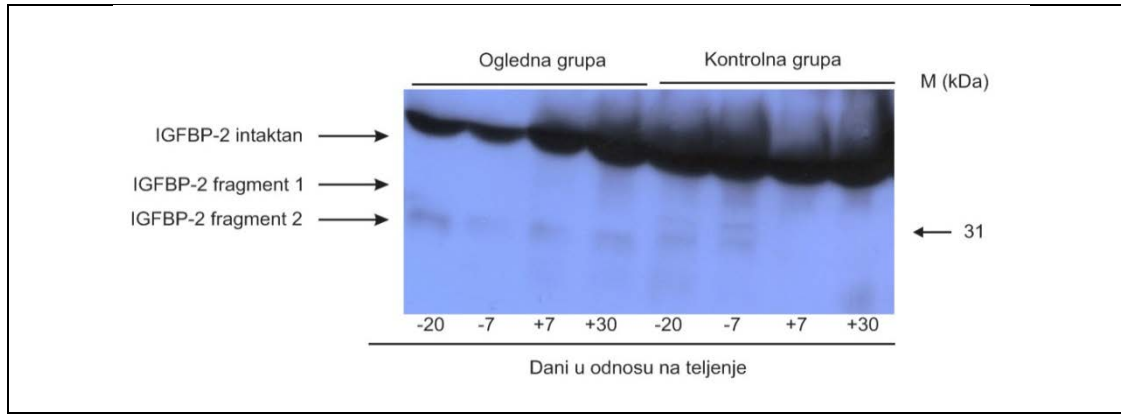
**Tabela 5.9.1.** Relativna zastupljenost IGFBP-2 u krvnom serumu junica kontrolne i ogledne grupe izražena kao  $\bar{X} \pm SD$ , uz prikaz statističke značajnosti razlika

Dan u odnosu na teljenje	IGFBP-2 (AU/10 $\mu$ L)		Značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
-20.	9,54 $\pm$ 1,25 <sup>A</sup>	9,34 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>	NZ
-7.	13,65 $\pm$ 0,54 <sup>B</sup>	9,46 $\pm$ 1,08 <sup>a, b</sup>	P < 0,05
+7.	14,35 $\pm$ 0,42 <sup>C</sup>	10,67 $\pm$ 0,32 <sup>b</sup>	P < 0,05
+30.	17,51 $\pm$ 0,80 <sup>D</sup>	10,37 $\pm$ 1,37 <sup>a, b</sup>	P < 0,05

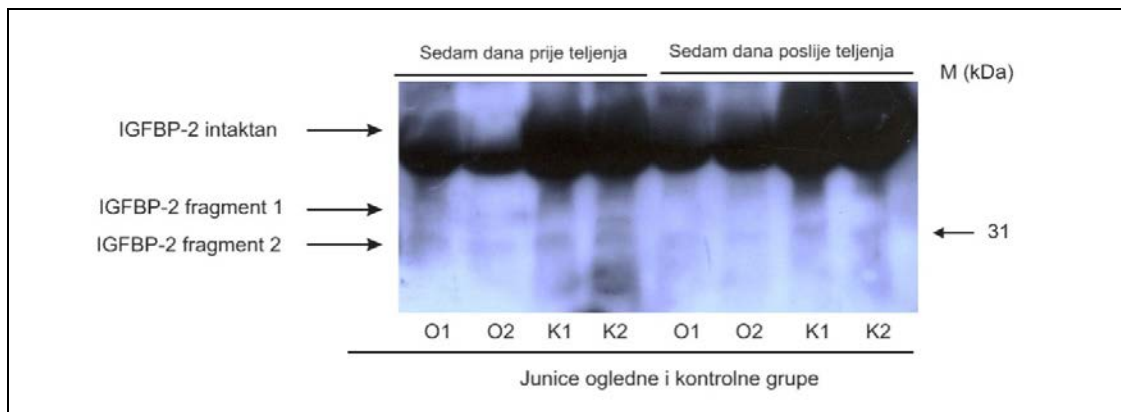
NZ - razlika nije statistički značajna;; A/a, B/b, C/c, D/d – različita slova ukazuju na statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) između vrijednosti u okviru kontrolne, odnosno ogledne grupe

Iz podataka prikazanih u tabeli 5.9.1. može se vidjeti da se relativna zastupljenost IGFBP-2 u krvnom serumu junica kontrolne i ogledne grupe nije statistički značajno razlikovala 20. dana prije teljenja, dok je u ostalim periodima ispitivanja kod junica ogledne grupe ustanovljena statistički značajno niža relativna zastupljenost IGFBP-2. Relativna zastupljenost IGFBP-2 unutar ogledne grupe junica tokom različitih perioda ispitivanja statistički se značajno razlikovala samo između uzoraka uzetih 20. dana prije i 7. dana nakon teljenja, dok su kod junica kontrolne grupe ustanovljene statistički značajne razlike između svih perioda ispitivanja.

Na slikama 5.9.1. i 5.9.2. su prikazani autoradiogrami imunoblotova za IGFBP-2 u reprezentativnim uzorcima krvnih seruma junica.



**Slika 5.9.1.** Autoradiogram imunoblota za serumski IGFBP-2 kod junica kontrolne i ogledne grupe. Uzorci uzeti 20. i 7. dana prije i 7. i 30. dana nakon teljenja



**Slika 5.9.2.** Autoradiogram imunoblota za serumski IGFBP-2 kod junica kontrolne i ogledne grupe. Uzorci uzeti 7. dana prije i 7. dana nakon teljenja

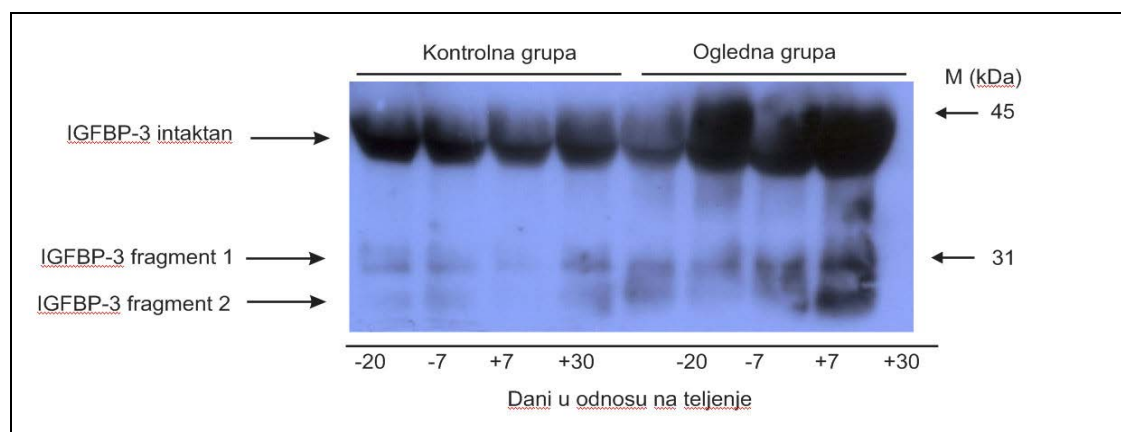
**Tabela 5.9.2.** Relativna zastupljenost IGFBP-3 u krvnom serumu junica kontrolne i ogledne grupe izražena kao  $\bar{X} \pm SD$ , uz prikaz statističke značajnosti razlika

Dan u odnosu na teljenje	IGFBP-3 (AU/10 $\mu$ L)		Značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
-20.	10,51 $\pm$ 0,84 <sup>A</sup>	10,66 $\pm$ 0,73 <sup>a</sup>	P < 0,001
-7.	10,35 $\pm$ 0,69 <sup>A</sup>	12,09 $\pm$ 0,73 <sup>b</sup>	P < 0,001
+7	9,23 $\pm$ 0,54 <sup>B</sup>	13,56 $\pm$ 0,38 <sup>c</sup>	P < 0,001
+30	10,52 $\pm$ 0,67 <sup>A</sup>	14,59 $\pm$ 0,57 <sup>d</sup>	P < 0,001

NZ - razlika nije statistički značajna;; A/a, B/b, C/c, D/d – različita slova ukazuju na statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) između vrijednosti u okviru kontrolne, odnosno ogledne grupe

Iz podataka prikazanih u tabeli 5.9.2. može se vidjeti da je relativna zastupljenost IGFBP-3 u krvnom serumu junica ogledne grupe bila statistički značajno viša u odnosu na junice kontrolne grupe u svim periodima ispitivanja. Relativna zastupljenost IGFBP-3 unutar ogledne grupe junica tokom različitih perioda ispitivanja statistički se značajno razlikovala između svih perioda ispitivanja, dok su kod junica kontrolne grupe ustanovljene statistički značajne razlike samo između uzoraka uzetih 7. dana nakon teljenja u odnosu na ostale periode ispitivanja.

Na slici 5.9.3 je prikazan autoradiogram imunoblota za IGFBP-3 u reprezentativnim uzorcima krvnih seruma junica.



**Slika 5.9.3.** Autoradiogram imunoblota za serumski IGFBP-3 kod junica kontrolne i ogledne grupe. Uzorci uzeti 20. i 7. dana prije i 7. i 30. dana nakon teljenja

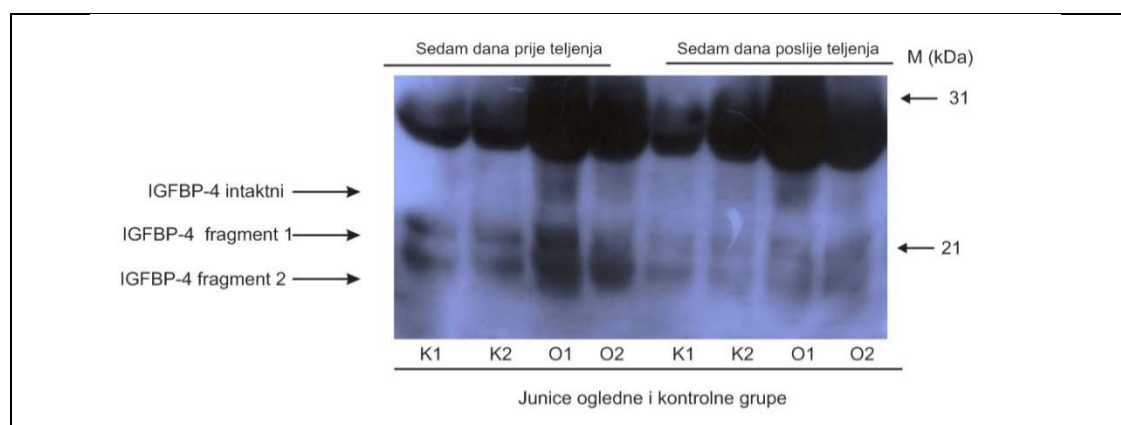
**Tabela 5.9.3.** Relativna zastupljenost IGFBP-4 u krvnom serumu junica kontrolne i ogledne grupe izražena kao  $\bar{X} \pm SD$ , uz prikaz statističke značajnosti razlika

Dan u odnosu na teljenje	IGFBP-4 (AU/10 $\mu$ L)		Značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
-20.	12,12 $\pm$ 1,31 <sup>A</sup>	12,27 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>	P < 0,001
-7.	18,12 $\pm$ 0,65 <sup>B,D</sup>	12,87 $\pm$ 0,82 <sup>a</sup>	P < 0,001
+7.	16,83 $\pm$ 0,89 <sup>C</sup>	13,96 $\pm$ 0,36 <sup>b</sup>	P < 0,001
+30.	17,50 $\pm$ 0,99 <sup>D</sup>	14,47 $\pm$ 0,86 <sup>b</sup>	P < 0,001

NZ - razlika nije statistički značajna;; A/a, B/b, C/c, D/d – različita slova ukazuju na statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) između vrijednosti u okviru kontrolne, odnosno ogledne grupe

Iz podataka prikazanih u tabeli 5.9.3. može se vidjeti da se relativna zastupljenost IGFBP-4 u krvnom serumu junica kontrolne i ogleđne grupe statistički značajno razlikovala u svim periodima ispitivanja. Relativna zastupljenost IGFBP-4 unutar ogleđne grupe junica tokom različitih perioda ispitivanja statistički se značajno razlikovala između oba prepartalna u odnosu na postpartalne periode uzorkovanja, dok su kod junica kontrolne grupe ustanovljene statistički značajne razlike između svih perioda uzorkovanja, sa izuzetkom razlike između uzoraka uzetih 7. dana prije i 30. dana nakon teljenja.

Na slici 5.9.4. je prikazan autoradiogram imunoblota za IGFBP-4 u reprezentativnim uzorcima krvnih seruma junica. Uzorci uzeti 7. dana prije i 7. dana nakon teljenja



**Slika 5.9.4.** Autoradiogram imunoblota za serumski IGFBP-4 kod junica kontrolne i ogleđne grupe. Uzorci uzeti 7. dana prije i 7. dana nakon teljenja



## 5.10. Koncentracija ukupnih proteina u krvnom serumu junica

Koncentracija ukupnih proteina u krvnom serumu junica kontrolne i ogledne grupe, kao i statistička značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe, je prikazana u tabeli 5.10.1.

**Tabela 5.10.1.** Koncentracija ukupnih proteina (g/L) u krvnom serumu junica kontrolne i ogledne grupe, izražena kao  $\bar{X} \pm SD$  uz prikaz statističke značajnosti razlika

Dan u odnosu na teljenje	Koncentracija ukupnih proteina (g/L)		Značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
-20.	76,04 ± 15,09	76,35 ± 16,48	NZ
-17.	74,68 ± 10,39	79,94 ± 13,98	NZ
-13.	68,66 ± 7,18	83,48 ± 11,04	p < 0,01
-7.	68,65 ± 12,82	79,03 ± 9,87	p < 0,05
-4.	65,93 ± 11,21	81,34 ± 12,96	p < 0,01
0. (dan teljenja)	79,12 ± 9,30	84,69 ± 11,43	NZ
+3.	76,07 ± 5,04	81,56 ± 18,81	NZ
+4.	72,49 ± 10,35	76,15 ± 12,50	NZ
+7.	75,25 ± 9,47	77,47 ± 9,89	NZ
+15.	75,15 ± 6,03	75,24 ± 13,40	NZ
+30.	86,11 ± 10,57	88,23 ± 12,56	NZ
+60.	86,47 ± 17,27	85,59 ± 17,37	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna

Iz tabele 5.10.1. se zapaža da se koncentracija ukupnih proteina u krvnom serumu junica kontrolne i ogledne grupe nije statistički značajno razlikovala 20. i 17. dana prije teljenja, iako su kod junica ogledne grupe ustanovljene nešto više vrijednosti. Od 13. do 4. dana prije teljenja koncentracija ukupnih proteina bila je statistički značajno niža kod junica kontrolne u odnosu na oglednu grupu. Od dana teljenja do 30. dana nakon teljenja koncentracija ukupnih proteina u krvnom serumu junica ogledne grupe bila je viša, ali ne statistički značajno u odnosu na vrijednosti kod junica kontrolne grupe. Šezdesetog dana nakon teljenja kod junica kontrolne

grupe ustanovljena je viša koncentracija ukupnih proteina u odnosu na junice ogledne grupe, ali razlika nije bila statistički značajna.

U tabeli 5.10.2. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija ukupnih proteina ustanovljenih u različitim periodima ispitivanja unutar kontrolne grupe junica.

**Tabela 5.10.2.** Statistička značajnost razlika između koncentracija ukupnih proteina ustanovljenih u različitim periodima ispitivanja unutar kontrolne grupe junica

Dan AP/PP	-20.											
-17.	NZ	-17.										
-13.	NZ	NZ	-13.									
-7.	NZ	NZ	NZ	-7.								
-4.	*	NZ	NZ	NZ	-4.							
Partus	NZ	NZ	**	**	**	Partus						
+3.	NZ	NZ	**	*	**	NZ	+3.					
+4.	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	0,059	NZ	+4.				
+7.	NZ	NZ	NZ	NZ	*	NZ	NZ	NZ	+7.			
+15.	NZ	NZ	*	NZ	**	NZ	NZ	NZ	NZ	+15.		
+30.	NZ	*	***	***	***	**	*	**	**	**	+30.	
+60.	NZ	*	***	**	**	NZ	*	*	*	*	NZ	

NZ – razlika nije statistički značajna; \*\*\* p<0,001; \*\* p<0,01; \* p<0,05

Koncentracija ukupnih proteina u krvnom serumu junica kontrolne grupe lagano je opadala od 20. do 4. dana prije teljenja, kada je dostigla najnižu vrijednost ustanovljenu tokom cijelog perioda ispitivanja. Na dan teljenja došlo je do porasta koncentracije ukupnih proteina, do gornje granice fizioloških vrijednosti. Od dana teljenja do 5. dana nakon teljenja koncentracija ukupnih proteina je lagano opadala, zatim se stabilizovala 7. i 15. dana nakon teljenja, da bi 30. i 60. dana nakon teljenja bile ustanovljene njene najviše vrijednosti tokom ispitivanog perioda. Obje vrijednosti bile su statistički značajno više u odnosu na sve ostale vrijednosti ustanovljene tokom ispitivanog perioda, sa izuzetkom vrijednosti ustanovljenih 20. dana prije teljenja i na sam dan teljenja.

U tabeli 5.10.3. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija ukupnih proteina ustanovljenih u različitim periodima ispitivanja unutar ogledne grupe.

**Tabela 5.10.3.** Statistička značajnost razlika između koncentracija ukupnih proteina ustanovljenih u različitim periodima ispitivanja unutar ogledne grupe junica

<b>Dan AP/PP</b>	<b>-20.</b>											
<b>-17.</b>	NZ	<b>-17.</b>										
<b>-13.</b>	NZ	NZ	<b>-13.</b>									
<b>-7.</b>	NZ	NZ	NZ	<b>-7.</b>								
<b>-4.</b>	NZ	NZ	NZ	NZ	<b>-4.</b>							
<b>Partus</b>	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	<b>Partus</b>						
<b>+3.</b>	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	<b>+3.</b>					
<b>+4.</b>	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	<b>+4.</b>				
<b>+7.</b>	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	<b>+7.</b>			
<b>+15.</b>	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	<b>+15.</b>		
<b>+30.</b>	*	NZ	NZ	*	NZ	NZ	NZ	NZ	*	*	<b>+30.</b>	
<b>+60.</b>	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	

NZ – razlika nije statistički značajna; \*\*\* p<0,001; \*\* p<0,01; \* p<0,05

Koncentracija ukupnih proteina u krvnom serumu junica ogledne grupe postepeno je rasla od 20. do 13. dana prije teljenja, zatim je blago opala 7. dana prije teljenja i ponovo nastavila da raste sve do dana teljenja. Tokom postpartalnog perioda, prosječna koncentracija ukupnih proteina je postepeno opadala 3. i 4., a zatim porasla 7. dana nakon teljenja. Petnaestog dana nakon teljenja ustanovljena je najniža vrijednost koncentracije ukupnih proteina u krvnom serumu junica ogledne grupe tokom cijelog ispitivanog perioda, ali je statistička značajnost razlike u odnosu na ostale periode ispitivanja izostala. Tridesetog dana nakon teljenja ustanovljena je najviša vrijednost prosječne koncentracije ukupnih proteina u toku ispitivanog perioda. Šezdesetog dana nakon teljenja ustanovljen je blagi pad koncentracije ukupnih proteina u krvnom serumu u odnosu na prethodni period ispitivanja.

### 5.11. Koncentracija albumina u krvnom serumu junica

Koncentracija albumina u krvnom serumu junica kontrolne i ogledne grupe, kao i statistička značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe prikazana je u tabeli 5.11.1.

**Tabela 5.11.1.** Koncentracija albumina (g/L) u krvnom serumu junica kontrolne i ogledne grupe, izražena kao  $\bar{X} \pm SD$ , uz prikaz statističke značajnosti razlika

Dan u odnosu na teljenje	Koncentracija albumina (g/L)		Značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
-20.	42,79 ± 4,51	42,83 ± 5,27	NZ
-17.	44,01 ± 3,97	48,61 ± 8,71	NZ
-13.	42,25 ± 5,69	46,48 ± 4,13	p < 0,05
-7.	41,15 ± 3,54	46,05 ± 5,36	p < 0,01
-4.	35,65 ± 8,58	48,64 ± 6,77	p < 0,001
0 (dan teljenja)	39,83 ± 4,11	42,97 ± 6,75	NZ
+3.	39,98 ± 4,30	48,67 ± 10,44	p < 0,01
+4.	42,52 ± 6,82	46,22 ± 9,67	NZ
+7.	40,92 ± 6,31	42,03 ± 8,62	NZ
+15.	41,10 ± 4,12	40,23 ± 8,01	NZ
+30.	43,49 ± 6,95	42,96 ± 8,48	NZ
+60.	44,72 ± 8,91	43,63 ± 6,14	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna; \*\*\* p<0,001; \*\* p<0,01; \* p<0,05

Iz tabele 5.11.1. se zapaža da se koncentracije albumina u krvnom serumu junica kontrolne i ogledne grupe nisu statistički značajno razlikovale 20. i 17. dana prije teljenja, iako su vrijednosti bile veće kod junica ogledne grupe. Trinaestog dana prije teljenja prosječna koncentracija albumina u krvnom serumu junica kontrolne grupe bila je statistički značajno niža u odnosu na junice ogledne grupe, a ovaj trend se održao sve do 4. dana prije teljenja. Na dan teljenja nije ustanovljena statistički značajna razlika u prosječnoj koncentraciji albumina između junica kontrolne i ogledne grupe, iako je vrijednost bila veća kod junica ogledne grupe. Trećeg dana nakon teljenja, kod junica kontrolne grupe ustanovljena je statistički značajno niža

koncentracija albumina u odnosu na junice ogledne grupe. Od 7. dana nakon teljenja do kraja ispitivanog perioda nisu ustanovljene statistički značajne razlike u vrijednostima koncentracije albumina između junica kontrolne i ogledne grupe. Sedmog dana nakon teljenja, koncentracija albumina kod kontrolne grupe junica bila je niža, a 15., 30. i 60. dana viša u odnosu na oglednu grupu.

U tabeli 5.11.2. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija albumina ustanovljenih u različitim periodima ispitivanja unutar kontrolne grupe junica.

**Tabela 5.11.2.** Statistička značajnost razlika između koncentracija albumina ustanovljenih u različitim periodima ispitivanja unutar kontrolne grupe junica

<b>Dan AP/PP</b>	<b>-20.</b>											
<b>-17.</b>	NZ	<b>-17.</b>										
<b>-13.</b>	NZ	NZ	<b>-13.</b>									
<b>-7.</b>	NZ	xxx	NZ	<b>-7.</b>								
<b>-4.</b>	**	**	*	*	<b>-4.</b>							
<b>Partus</b>	NZ	**	NZ	NZ	NZ	<b>Partus</b>						
<b>+3.</b>	*	*	NZ	NZ	NZ	NZ	<b>+3.</b>					
<b>+4.</b>	NZ	NZ	NZ	NZ	*	NZ	NZ	<b>+4.</b>				
<b>+7.</b>	NZ	NZ	NZ	NZ	*	NZ	NZ	NZ	<b>+7.</b>			
<b>+15.</b>	NZ	NZ	NZ	NZ	*	NZ	NZ	NZ	NZ	<b>+15.</b>		
<b>+30.</b>	NZ	NZ	NZ	NZ	**	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	<b>+30.</b>	
<b>+60.</b>	NZ	NZ	NZ	NZ	**	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	

NZ – razlika nije statistički značajna; \*\*\* p<0,001; \*\* p<0,01; \* p<0,05

Koncentracija albumina u krvnom serumu junica kontrolne grupe je 17. dana prije teljenja porasla u odnosu na 20. dan prije teljenja, a zatim je postepeno opadala do 4. dana prije teljenja, kada je ustanovljena najniža vrijednost tokom ispitivanog perioda. Ova vrijednost bila je statistički značajno niža u odnosu na sve ostale vrijednosti ustanovljene kod junica kontrolne grupe tokom ispitivanog perioda, sa izuzetkom onih ustanovljenih na dan teljenja i 3. dana nakon teljenja. Od dana teljenja koncentracija albumina je rasla do 4. dana nakon teljenja, blago opala 7. dana i zatim nastavila da raste do 60. dana nakon teljenja, kada je ustanovljena najviša vrijednost

tokom ispitivanog perioda. Ova vrijednost bila je statistički značajno viša jedino u odnosu na vrijednosti koncentracije albumina ustanovljene 3. dana prije teljenja.

U tabeli 5.11.3. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija albumina ustanovljenih u različitim periodima ispitivanja unutar ogledne grupe junica.

**Tabela 5.11.3.** Statistička značajnost razlika između koncentracija albumina ustanovljenih u različitim periodima ispitivanja unutar ogledne grupe junica

<b>Dan AP/PP</b>	<b>-20.</b>												
<b>-17.</b>	NZ	<b>-17.</b>											
<b>-13.</b>	NZ	NZ	<b>-13.</b>										
<b>-7.</b>	NZ		NZ	<b>-7.</b>									
<b>-4.</b>	**	**	*	*	<b>-4.</b>								
<b>Partus</b>	NZ	**	NZ	NZ	NZ	<b>Partus</b>							
<b>+3.</b>	*	*	NZ	NZ	NZ	NZ	<b>+3.</b>						
<b>+4.</b>	NZ	NZ	NZ	NZ	*	NZ	NZ	<b>+4.</b>					
<b>+7.</b>	NZ	NZ	NZ	NZ	*	NZ	NZ	NZ	<b>+7.</b>				
<b>+15.</b>	NZ	NZ	NZ	NZ	*	NZ	NZ	NZ	NZ	<b>+15.</b>			
<b>+30.</b>	NZ	NZ	NZ	NZ	**	0,055	NZ	NZ	NZ	NZ	<b>+30.</b>		
<b>+60.</b>	NZ	NZ	NZ	NZ	**	NZ	0,055	NZ	NZ	NZ	NZ		

NZ – razlika nije statistički značajna; \*\*\* p<0,001; \*\* p<0,01; \* p<0,05

Koncentracija albumina kod junica ogledne grupe je 17. dana prije teljenja porasla u odnosu na 20. dan prije teljenja, a zatim se blago smanjila 13. i 7. dana prije teljenja. Trećeg dana prije teljenja došlo je do statistički značajnog porasta prosječne koncentracije albumina u odnosu na sve prepartalne vrijednosti, kao i vrijednosti ustanovljene od 5. dana nakon teljenja do kraja ispitivanog perioda. Na dan teljenja koncentracija albumina je opala u odnosu na prepartalne vrijednosti (sa izuzetkom vrijednosti ustanovljene 20. dana prije teljenja), iako je statistički značajna razlika ustanovljena samo u odnosu na 17. dan prije teljenja. Trećeg dana nakon teljenja, koncentracija albumina dostigla je najvišu vrijednost tokom ispitivanog perioda, a zatim je postepeno opadala sve do 15. dana nakon teljenja, kada je ustanovljena najniža vrijednost tokom ispitivanog perioda. Od 15. dana nakon teljenja prema kraju ispitivanog perioda ustanovljen je postepeni porast koncentracije albumina.

## 5.12. Koncentracija ukupnog bilirubina u krvnom serumu junica

Koncentracija ukupnog bilirubina u krvnom serumu junica kontrolne i ogledne grupe, kao i statistička značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe prikazana je u tabeli 5.12.1.

**Tabela 5.12.1.** Koncentracija ukupnog bilirubina ( $\mu\text{mol/L}$ ) u krvnom serumu junica kontrolne i ogledne grupe, izražena kao  $\bar{X} \pm \text{SD}$ , uz prikaz statističke značajnosti razlika

Dan u odnosu na teljenje	Koncentracija ukupnog bilirubina ( $\mu\text{mol/L}$ )		Značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
-20.	6,03 $\pm$ 1,51	6,27 $\pm$ 0,98	NZ
-17.	6,17 $\pm$ 1,79	6,86 $\pm$ 1,51	NZ
-13.	5,92 $\pm$ 1,29	7,39 $\pm$ 2,05	p < 0,05
-7.	5,59 $\pm$ 1,53	8,46 $\pm$ 2,02	p < 0,001
-4.	5,71 $\pm$ 1,14	7,81 $\pm$ 1,79	p < 0,001
-1.	8,19 $\pm$ 3,42	10,31 $\pm$ 2,02	p < 0,05
+1.	10,28 $\pm$ 4,53	11,97 $\pm$ 5,19	NZ
+3.	13,79 $\pm$ 8,03	13,64 $\pm$ 4,82	NZ
+5.	11,07 $\pm$ 3,55	10,43 $\pm$ 3,10	NZ
+7.	12,35 $\pm$ 5,62	8,88 $\pm$ 4,68	NZ
+15.	9,33 $\pm$ 3,85	9,49 $\pm$ 2,72	NZ
+30.	7,89 $\pm$ 2,90	7,42 $\pm$ 2,67	NZ
+60.	7,51 $\pm$ 2,09	7,68 $\pm$ 2,25	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna; \*\*\* p<0,001; \*\* p<0,01; \* p<0,05

Iz tabele 5.12.1. se zapaža da se koncentracija ukupnog bilirubina u krvnom serumu junica kontrolne i ogledne grupe nije statistički značajno razlikovala 20. i 17. dana prije teljenja, iako su apsolutne vrijednosti bile veće kod junica ogledne grupe. Od 13. dana prije teljenja do dana teljenja koncentracija ukupnog bilirubina je bila statistički značajno niža kod junica kontrolne grupe u odnosu na oglednu. Nakon teljenja nisu ustanovljene statistički značajne razlike u vrijednostima koncentracije ukupnog bilirubina između junica kontrolne i ogledne grupe. Koncentracija ukupnog

bilirubina, ustanovljena 1. dana nakon teljenja, je bila niža, a u periodu od 3. do 7. dana nakon teljenja viša kod junica kontrolne grupe. Nakon toga koncentracije ukupnog bilirubina u krvnom serumu ispitanih grupa junica bile su ujednačene.

U tabeli 5.12.2. je prikazana statistička značajnost razlika između koncentracija ukupnog bilirubina ustanovljenih u različitim periodima ispitivanja unutar kontrolne grupe junica.

**Tabela 5.12.2.** Statistička značajnost razlika između koncentracija ukupnog bilirubina ustanovljenih u različitim periodima ispitivanja unutar kontrolne grupe junica

Dan AP/PP	-20.												
-17.	NZ	-17.											
-13.	NZ	NZ	-13.										
-7.	NZ	NZ	NZ	-7.									
-4.	NZ	NZ	NZ	NZ	-4.								
-1.	*	NZ	*	*	*	-1.							
+1.	**	**	**	**	**	NZ	+1.						
+3.	**	**	**	**	**	*	NZ	+3.					
+5.	***	**	***	***	***	*	NZ	NZ	+5.				
+7.	***	***	***	***	***	*	NZ	NZ	NZ	+7.			
+15.	**	**	***	**	**	NZ	NZ	*	NZ	NZ	+15.		
+30.	*	**	**	*	*	NZ	NZ	*	*	**	NZ	+30.	
+60.	*	*	*	*	**	NZ	*	**	**	**	*	NZ	

NZ – razlika nije statistički značajna; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$

Koncentracija ukupnog bilirubina u krvnom serumu junica kontrolne grupe bila je ujednačena u periodu od 20. do 4. dana prije teljenja. Dan prije teljenja došlo je do statistički značajnog porasta koncentracije ukupnog bilirubina u odnosu na sve vrijednosti ustanovljene prepartalno, sa izuzetkom vrijednosti ustanovljene 17. dana prije teljenja. Od dana teljenja ustanovljen je porast koncentracije ukupnog bilirubina, a 3. dana nakon teljenja ustanovljena je najviša vrijednost tokom ispitivanog perioda. Ova vrijednost je bila statistički značajno viša u odnosu na ostale vrijednosti ustanovljene tokom ispitivanog perioda, sa izuzetkom 1., 4. i 7. dana nakon teljenja. Nakon opadanja 4. i porasta 7. dana nakon teljenja, koncentracija ukupnog bilirubina u krvnom serumu junica kontrolne grupe je postepeno opadala prema 60. danu nakon



teljenja, a statistički značajna razlika ustanovljena je samo između vrijednosti registrovanih 15. i 60. dana nakon teljenja.

U tabeli 5.12.3. je prikazana statistička značajnost razlika između koncentracija ukupnog bilirubina ustanovljenih u različitim periodima ispitivanja unutar ogleadne grupe junica.

**Tabela 5.12.3.** Statistička značajnost razlika između koncentracija ukupnog bilirubina ustanovljenih u različitim periodima ispitivanja unutar ogleadne grupe junica

<b>Dan AP/PP</b>	<b>-20.</b>												
<b>-17.</b>	NZ	<b>-17.</b>											
<b>-13.</b>	NZ	NZ	<b>-13.</b>										
<b>-7.</b>	**	*	NZ	<b>-7.</b>									
<b>-4.</b>	**	NZ	NZ	NZ	<b>-4.</b>								
<b>-1.</b>	***	***	***	**	***	<b>-1.</b>							
<b>+1.</b>	**	***	**	xxx	xxx	NZ	<b>+1.</b>						
<b>+3.</b>	***	***	***	***	***	*	NZ	<b>+3.</b>					
<b>+5.</b>	***	***	**	NZ	**	NZ	NZ	NZ	<b>+5.</b>				
<b>+7.</b>	0,053	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	**	NZ	<b>+7.</b>			
<b>+15.</b>	**	**	*	NZ	NZ	NZ	*	**	NZ	NZ	<b>+15.</b>		
<b>+30.</b>	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	**	**	**	**	NZ	NZ	<b>+30.</b>	
<b>+60.</b>	*	NZ	NZ	NZ	NZ	**	**	**	**	NZ	0,052	NZ	

NZ – razlika nije statistički značajna; \*\*\* p<0,001; \*\* p<0,01; \* p<0,05

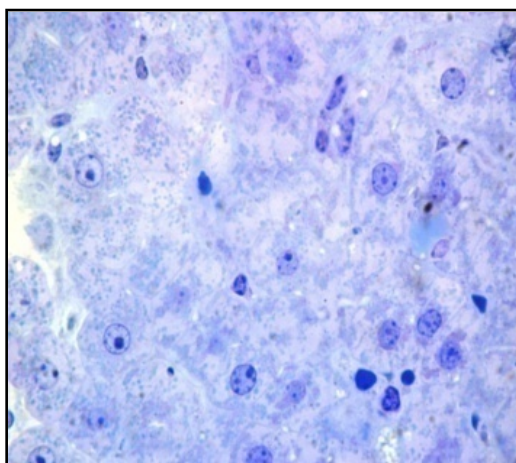
Dvadesetog dana prije teljenja ustanovljena je najniža vrijednost koncentracije ukupnog bilirubina kod junica ogleadne grupe, koja je bila statistički značajno niža u odnosu na sve vrijednosti ustanovljene tokom perioda ispitivanja, sa izuzetkom onih ustanovljenih 17. i 13. dana prije i 30. dana nakon teljenja. Od 17. do 7. dana prije teljenja ustanovljen je porast koncentracije ukupnog bilirubina u odnosu na 20. dan prije teljenja, a 4. dana prije teljenja njeno opadanje u odnosu na prethodni period ispitivanja. Dan prije teljenja koncentracija ukupnog bilirubina bila je statistički značajno viša u odnosu na sve prepartalne vrijednosti, kao i vrijednosti ustanovljene 30. i 60. dana nakon teljenja, dok je u odnosu na vrijednosti ustanovljene 3. dana nakon teljenja bila statistički značajno niža. Nakon teljenja, koncentracija ukupnog bilirubina je rasla do 3. dana nakon teljenja, kada je dostigla najvišu vrijednost

ustanovljenu tokom ispitivanog perioda. Ova vrijednost bila je statistički značajno viša u odnosu na sve ostale vrijednosti ustanovljene tokom perioda ispitivanja, sa izuzetkom 1. dana nakon teljenja. Četvrtog i 7. dana nakon teljenja došlo je do postepenog opadanja koncentracije ukupnog bilirubina, a 15. dana do njenog ponovnog povišenja. Koncentracija ukupnog bilirubina ustanovljena 30. dana nakon teljenja je bila niža u odnosu na 15. dan nakon teljenja, iako nije ustanovljena statistička značajnost razlika, da bi 60. dana ponovo došlo do njenog blagog porasta.

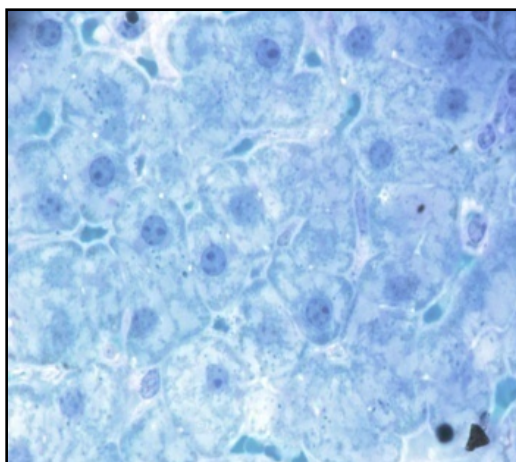
### 5.13. Stepen zamašćenja i sadržaj glikogena u jetri junica

U reprezentativnim uzorcima tkiva jetre uzetim biopsijom 7. dana prije teljenja kod junica kontrolne i ogledne grupe nije utvrđeno zamašćenje jetre. Naime, stepen zamašćenja je kod obje grupe bio  $0,00 \pm 0,00$  % masti u hepatocitima. Sedmog dana nakon teljenja kod junica kontrolne grupe ustanovljen je umjeren ( $20,25 \pm 6,51$  % masti), dok je kod junica ogledne grupe ustanovljen blagi stepen zamašćenja jetre ( $6,70 \pm 4,45$  % masti). Razlika u stepenu postpartalnog zamašćenja jetre kontrolne i ogledne grupe junica je bila statistički značajna ( $p < 0,001$ ). Takođe, značajno je naglasiti da unutar ogledne grupe ni kod jedne junice postpartalno nije utvrđen umjeren ili izrazit stepen zamašćenja, jer je kod svih životinja stepen zamašćenja bio manji od 20 %. U kontrolnoj grupi je 58,33 % junica imalo umjeren stepen zamašćenja jetre, odnosno sadržaj masti u hepatocitima od 20 do 40 %.

Histološkim pregledom uzoraka tkiva jetre junica ogledne i kontrolne grupe uzetih biopsijom 7. dana prije teljenja nije utvrđeno prisustvo masnih kapljica u hepatocitima (Slike 5.13.1. i 5.13.2.). Na histološkim preparatima se može zapaziti da su jedra hepatocita junica kontrolne grupe bila većinom heterohromatična i da su imala uglavnom po jedno jedarce. S druge strane, jedra hepatocita junica ogledne grupe su bila većinom euhromatična i imala su većinom po dva jedarca.

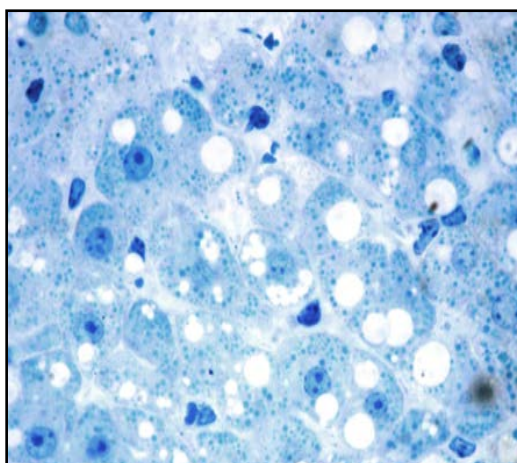


*Slika 5.13.1.* Hepatociti junice kontrolne grupe 7. dana prije teljenja (Toluidin plavo, uvećanje 100 puta)

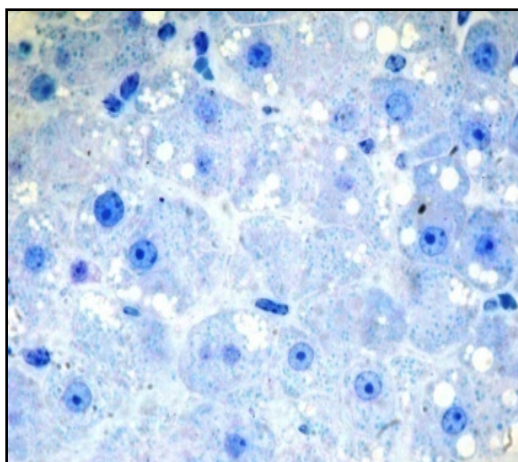


**Slika 5.13.2.** Hepatociti junice ogledne grupe 7. dana prije teljenja (Toluidin plavo, uvećanje 100 puta)

Histološkim pregledom uzoraka tkiva jetre junica ogledne grupe uzetih biopsijom 7. dana nakon teljenja utvrđeno je da se u hepatocitima nalaze intracitoplazmatske pojedinačne sitne masne kapljice. Oblik i veličina hepatocita su bili nepromijenjeni, kao i odnos između hepatocita i sinusoida. Jedra hepatocita su takođe bila nepromijenjena (Slika 5.13.3). Histološkim pregledom uzoraka tkiva jetre junica kontrolne grupe 7. dana nakon teljenja ustanovljeno je da je histološki nalaz varirao i bio u korelaciji sa količinom masti u hepatocitima. Sa povećanjem sadržaja masti veličina masnih kapljica se povećavala, a zamašćenje je zahvatalo i hepatocite udaljene od centralne vene (Slika 5.13.4).

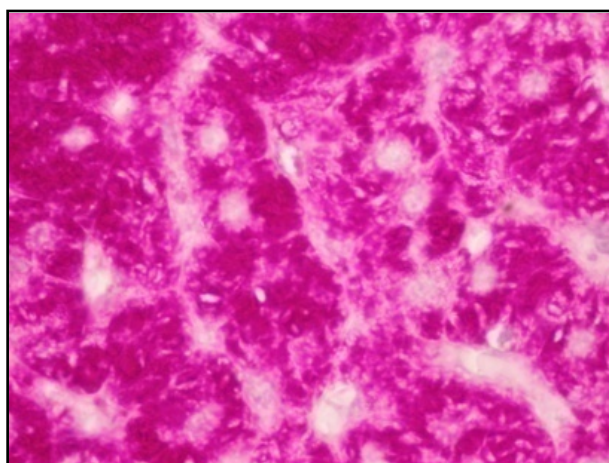


**Slika 5.13.3.** Hepatociti junice kontrolne grupe 7. dana nakon teljenja (Toluidin plavo, uvećanje 100 puta)

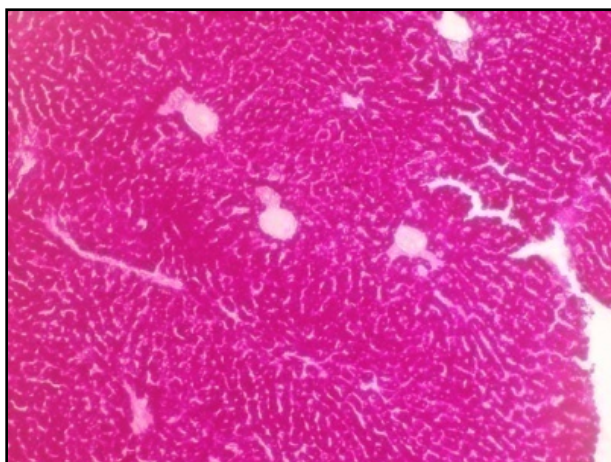


**Slika 5.13.4.** Hepatociti junice ogleadne grupe 7. dana nakon teljenja (Toluidin plavo uvećanje 100 puta)

Prepartalno je kod obje grupe junica glikogen ispunjavao hepatocite (Slike 5.13.5. i 5.13.6.). Kod svih junica obje grupe su se u hepatocitima jasno uočavale granule crvene boje ravnomjerno raspoređene u citoplazmi (+++). Iako je glikogen bio značajno prisutan u hepatocitima obje grupe junica 7. dana prije teljenja, kod junica ogleadne grupe je ustanovljena nešto veća zastupljenost glikogena, odnosno njihovi hepatociti su bili u potpunosti ispunjeni glikogenom.

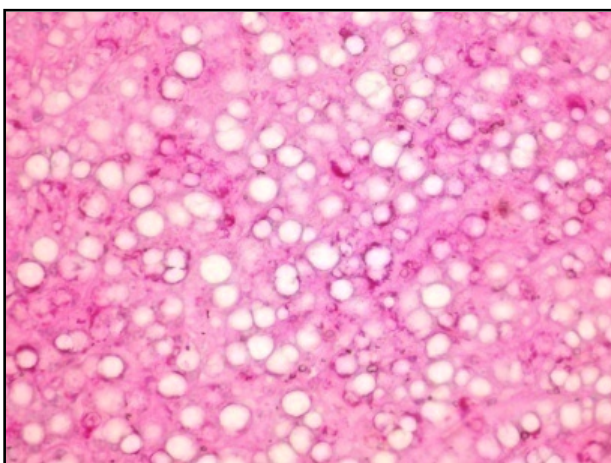


**Slika 5.13.5.** Hepatociti junice kontrolne grupe 7. dana prije teljenja (PAS, uvećanje 100 puta )



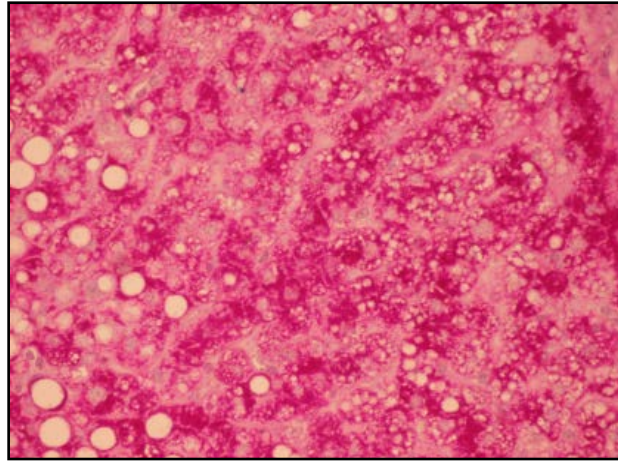
**Slika 5.13.6.** Hepatociti junice ogleadne grupe 7. dana prije teljenja (PAS, uvećanje 10 puta)

Postpartalno je kod junica kontrolne grupe sadržaj glikogena u tkivu jetre bio djelimično smanjen ili ispod vrijednosti optimalnog sadržaja (Slika 5.13.7.). Naime, kod 16,67% životinja je utvrđeno smanjenje glikogena ispod optimalnog sadržaja (+), dok je u hepatocitima 41,67% junica iz ogleadne grupe utvrđen nešto umanjen sadržaj glikogena (++) . Kod ostalih junica kontrolne grupe glikogen je bio prisutan u citoplazmi u optimalnoj količini (+++). Kod junica ogleadne grupe sadržaj glikogena u hepatocitima postpartalno je bio smanjen, ali ne toliko kao kod kontrolne grupe (Slika 5.13.8.). Naime kod 20% jedinki je utvrđen nešto umanjen sadržaj glikogena u citoplazmi (++) , dok je kod ostalih glikogen bio prisutan u optimalnoj količini (+++).



**Slika 5.13.7.** Hepatociti junice kontrolne grupe 7. dana nakon teljenja (PAS, uvećanje 40 puta)





*Slika 5.13.8.* Hepatociti junice ogledne grupe 7. dana nakon teljenja (PAS, uvećanje 40 puta)

#### **5.14. Mliječnost junica i trajanje servis perioda**

Podaci o dnevnoj mliječnosti ( $\bar{X} \pm SD$ ) junica kontrolne i ogledne grupe u periodu od 7. do 60. dana laktacije i statistička značajnost razlika (p) između junica kontrolne i ogledne grupe istog dana laktacije dati su u tabelama 5.14.1., 5.14.2. i 5.14.3.



**Tabela 5.14.1.** Prosječna dnevna mliječnost ( $\bar{X} \pm SD$ ) i statistička značajnost razlika u mliječnosti junica kontrolne i ogledne grupe od 7. do 24. dana laktacije

Dan laktacije		7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	20.	21.	22.	23.	24.
X (L)	kontrolne	18,47	19,93	20,07	21,00	20,07	20,53	20,60	20,20	20,93	21,20	22,47	22,47	22,60	23,20	24,00	23,53	24,20	24,27
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	3,83	2,81	2,22	3,44	3,43	2,95	2,41	3,63	3,83	3,89	3,72	3,98	4,45	5,09	4,78	6,58	6,57	5,61	
X (L)	ogledne	9,07	10,00	12,47	14,59	16,35	16,49	18,40	17,51	19,73	20,51	21,12	20,72	21,90	19,98	22,67	24,66	23,95	22,97
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	1,71	1,73	5,23	5,11	3,66	6,41	4,37	6,08	6,33	5,00	5,18	4,71	6,02	7,57	4,13	5,31	6,72	7,37	
p		***	***	***	***	**	*	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna; \*\*\* p<0,001; \*\* p<0,01; \* p<0,05

**Tabela 5.14.2.** Prosječna dnevna mliječnost ( $\bar{X} \pm SD$ ) i statistička značajnost razlika u mliječnosti junica kontrolne i ogledne grupe od 25. do 42. dana laktacije

Dan laktacije		25.	26.	27.	28.	29.	30.	31.	32.	33.	34.	35.	36.	37.	38.	39.	40.	41.	42.
X (L)	kontrolne	24,57	25,07	25,07	25,27	25,13	24,73	25,00	25,33	24,97	24,97	25,40	27,83	27,93	28,20	28,00	26,93	25,40	25,07
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	5,99	6,04	6,11	6,13	5,82	5,11	5,15	4,29	4,38	4,54	4,38	4,51	3,49	3,53	3,27	3,65	4,21	4,20	
X (L)	ogledne	24,87	25,80	28,20	29,43	28,87	30,12	29,60	31,47	30,97	31,35	31,80	31,27	30,20	31,00	29,33	28,87	28,76	28,76
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	
	6,63	4,78	2,78	4,15	4,27	4,54	3,27	3,42	5,84	5,00	5,14	4,77	3,97	4,99	4,89	4,45	4,06	5,09	
p		NZ	NZ	NZ	*	*	**	**	***	**	***	***	*	NZ	NZ	NZ	NZ	*	*

NZ – razlika nije statistički značajna; \*\*\* p<0,001; \*\* p<0,01; \* p<0,05

**Tabela 5.14.3.** Prosječna dnevna mliječnost ( $\bar{X} \pm SD$ ) i statistička značajnost razlika u mliječnosti junica kontrolne i ogledne grupe od 43. do 60. dana laktacije

Dan laktacije		43.	44.	45.	46.	47.	48.	49.	50.	51.	52.	53.	54.	55.	56.	57.	58.	59.	60.
X (L)	kontrolne	25,13	24,20	25,53	26,47	26,87	27,53	28,00	25,57	25,80	26,20	28,87	28,00	28,30	28,47	28,87	28,87	28,00	28,87
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	4,39	3,76	3,91	3,31	3,46	3,11	2,75	4,22	3,34	3,57	1,85	2,75	3,62	2,17	2,00	1,85	2,75	1,85	
X (L)	ogledne	28,68	28,33	29,00	28,77	30,60	29,27	30,10	30,60	32,07	33,00	31,87	32,20	31,73	34,40	35,00	34,40	34,13	36,13
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	
	5,53	5,28	4,50	3,05	3,07	4,18	3,31	3,62	3,83	3,28	4,81	5,13	6,58	4,94	5,08	6,23	5,73	6,76	
p		NZ	*	*	*	**	NZ	NZ	**	***	***	*	**	NZ	***	***	**	***	***

NZ – razlika nije statistički značajna; \*\*\* p<0,001; \*\* p<0,01; \* p<0,05

Podaci prikazani u tabelama 5.14.1., 5.14.2. i 5.14.3. ukazuju da su junice ogledne grupe u periodu od 7. do 12. dana laktacije imale statistički značajno nižu prosječnu dnevnu mliječnost u odnosu na junice kontrolne grupe. U periodu od 13. do 27. dana laktacije nije ustanovljena statistički značajna razlika u prosječnoj dnevnoj mliječnosti između junica ogledne i kontrolne grupe, dok je u periodu od 28. do 36. dana laktacije prosječna dnevna mliječnost bila statistički značajno viša kod junica ogledne grupe u odnosu na kontrolnu. Junice ogledne grupe su od 41. dana laktacije do kraja ispitivanog perioda imale višu prosječnu dnevnu mliječnost u odnosu na junice kontrolne grupe, iako statistički značajne razlike nisu ustanovljene 43., 48., 49. i 55. dana laktacije.

Ukupna proizvodnja mlijeka tokom ispitivanog perioda bila je 1344,16 litara po grlu za junice kontrolne grupe, odnosno 1434,06 litara po grlu za junice ogledne grupe. Dnevni prosjek proizvodnje mlijeka tokom ispitivanog perioda bio je  $24,89 \pm 2,81$  litara za junice kontrolne grupe, odnosno  $26,56 \pm 6,61$  litara za junice ogledne grupe. Tokom ispitivanog perioda, junice ogledne grupe proizvele su ukupno 1348,20 litara mlijeka više u odnosu na junice kontrolne grupe.

Servis period kod junica kontrolne grupe je trajao  $148,62 \pm 92,56$  dana, a kod junica ogledne grupe  $97,56 \pm 24,53$  dana. Razlika u trajanju servis perioda između junica ogledne i kontrolne grupe bila je statistički značajna ( $p < 0,05$ ).

## 6. DISKUSIJA

Jedan od često korištenih načina ispitivanja uticaja hormona na funkciju pojedinih organa i cijelog organizma je vještačko suprimiranje njihove sinteze i/ili sekrecije. Tako se uticaj tireoidnih hormona na zdravlje i proizvodne sposobnosti visokomliječnih krava može utvrditi izazivanjem hipotireoze davanjem farmakoloških doza antitireoidnih supstanci (Villar i sar., 2002; Györfy i sar. 2009).

U starijoj literaturi postoje podaci određenog broja autora o uticaju indukovane hipotireoze na rast i toвне karakteristike junadi i ovaca, pri čemu je hipotireoza indukovana davanjem tiouracila, PTU i metimazola (Burroughs i sar., 1960; Rumsey i sar., 1983a, 1985; Chandrasekhar i sar., 1985a; Follet i Potts, 1990). Novija istraživanja, u kojima je uticaj aktivnosti tireoidee na proizvodne i reproduktivne karakteristike ispitivan u uslovima indukovane hipotireoze, sprovedena su na junicama i kravama brahman rase, koja pripada tovnim rasama (De Moraes i sar., 1998; Thrift i sar., 1999a,b; Bernal i sar., 1999). Prema našim saznanjima, jedini dostupni podaci o upotrebi PTU kod goveda holštajn rase potiču iz studije koju su sproveli Stewart i saradnici (1994), sa ciljem da ustanove uticaj aktivnosti tireoidee na koncentraciju polnih hormona i manifestne znakove estrusa junica. Ovi autori su koristili PTU u dozi od 20 mg/100kg tjelesne mase, odnosno dvadeset puta manju dozu u odnosu na onu upotrebljenu u ovom istraživanju.

Indukcija hipotireoze kod visokomliječnih krava, kod kojih je značaj tireoidnih hormona u pripremi za laktaciju sigurno veliki, ali nedovoljno ispitan, time još više dobija na važnosti. Imajući u vidu razlike u aktivnosti homeostatskih i homeoretskih mehanizama u peripartalnom periodu između tovnih i rasa kombinovanih proizvodnih sposobnosti u odnosu na visokomliječne rase, kao što je holštajn, za očekivati je da će u odgovoru na indukciju hipotireoze i u kasnijem periodu, kada se očekuje kompenzatorna pojačana aktivnost tireoidee, postojati značajne razlike.

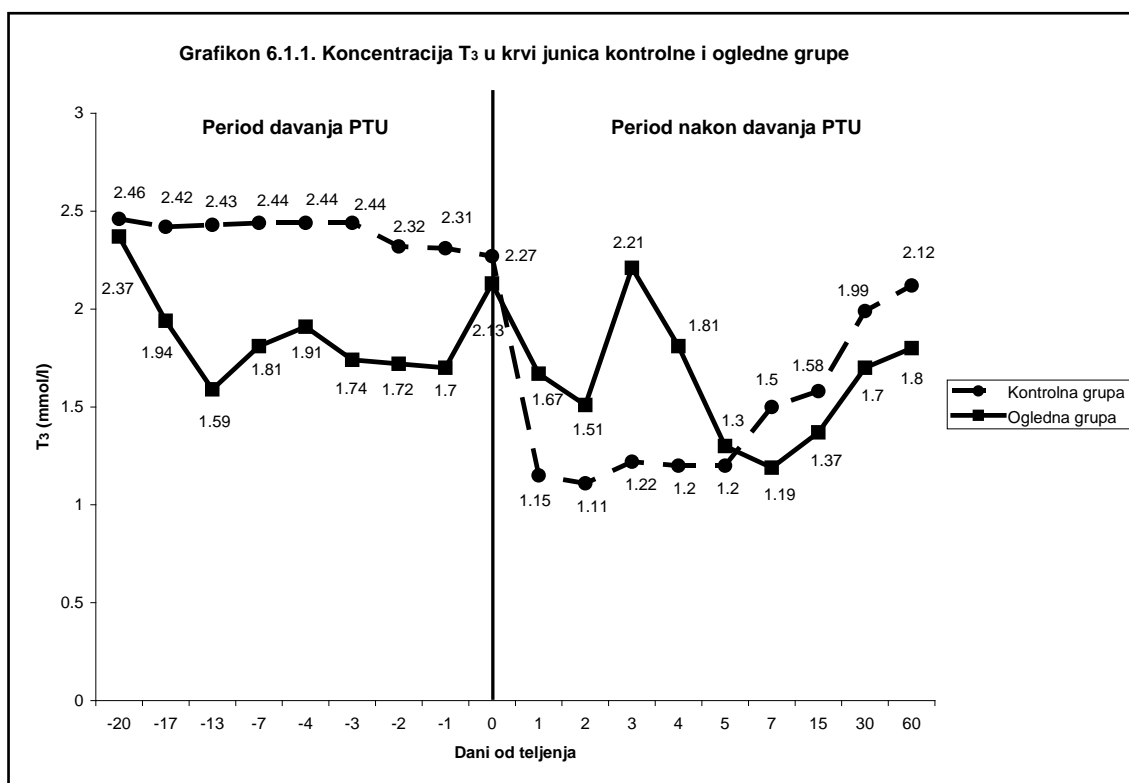
U tom smislu, cilj istraživanja je bio da se doprinese razjašnjenju uticaja tireoidnih hormona na proizvodne i reproduktivne sposobnosti i zdravlje visokomliječnih krava praćenjem parametara endokrinog i metaboličkog statusa nakon perioda prepartalne hipotireoze indukovane davanjem farmakološke doze PTU.

U skladu sa literaturnim podacima o efektu različitih doza PTU na aktivnost tireoidee na centralnom i perifernom nivou kod goveda tovnih i kombinovanih

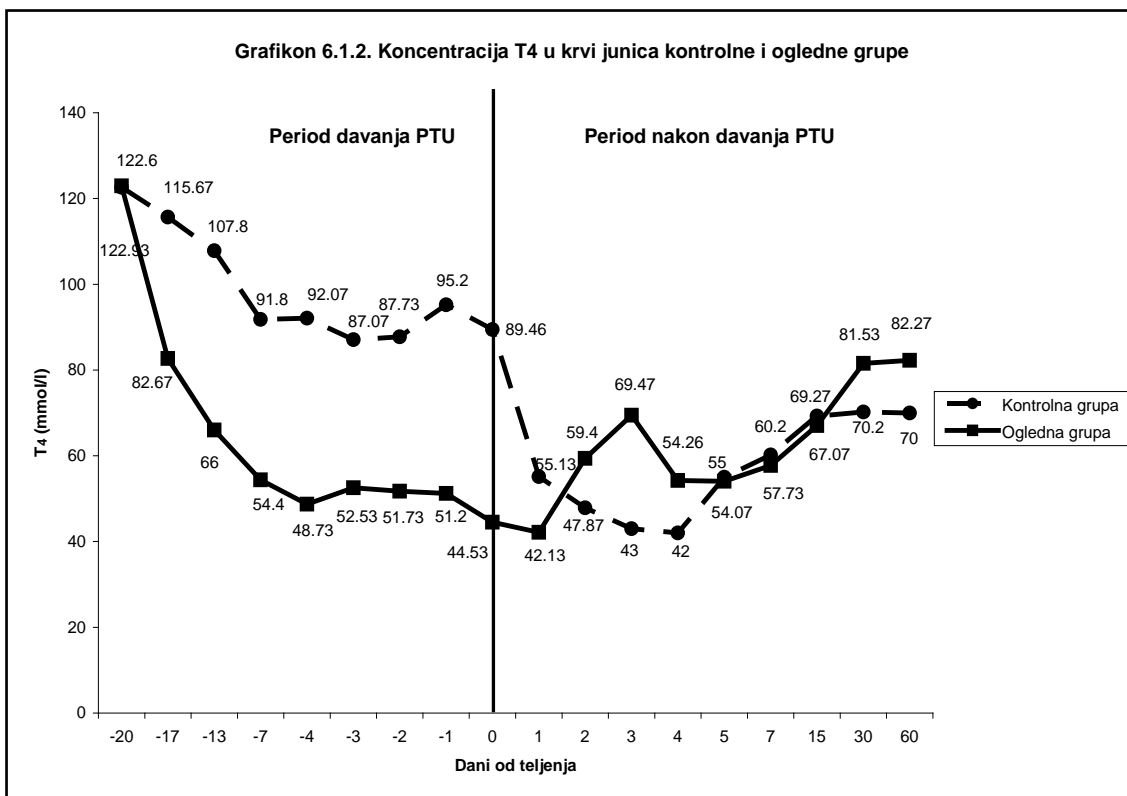
proizvodnih karakteristika (Rumsey i sar., 1985; Elsasser i sar., 1992, 1993; DeMoraes i sar., 1998;Thrift i sar., 1999 a,b), rezultatima koje su na junicama holštajn rase dobili Stewart i saradnici (1994), kao i rezultatima našeg preliminarnog istraživanja, kao farmakološka doza PTU u ovom istraživanju uzeta je doza od 4 mg/kg tjelesne mase.

### 6.1. Uticaj aplikacije PTU na tireoidni status jedinke

Koncentracije tireoidnih hormona u krvi junica ogledne i kontrolne grupe prikazane su na grafikonima 6.1.1., odnosno 6.1.2. Detaljna statistička obrada tih podataka data je u poglavlju Rezultati, a na grafikonima je prikazan trend kretanja koncentracija u cilju lakšeg tumačenja dobijenih rezultata.



**Grafikon 6.1.1.** Koncentracija T<sub>3</sub> u krvi junica kontrolne i ogledne grupe



**Grafikon 6.1.2.** Koncentracija T<sub>4</sub> u krvi junica kontrolne i ogledne grupe

Rezultati dobijeni u ovom radu ukazuju da PTU ima izrazito negativan uticaj na koncentraciju T<sub>3</sub> u krvnom serumu junica. Naime, tokom cijelog perioda aplikacije PTU, koncentracije T<sub>3</sub> su u krvi junica ogledne grupe bile statistički značajno niže nego u krvi junica kontrolne grupe. Ovaj rezultat je očekivan, jer PTU djeluje inhibitory na aktivnost DIO1 u tkivu jetre, koja je odgovorna za konverziju T<sub>4</sub> u T<sub>3</sub> (Villar i sar., 2002). Potvrda ovakvog tumačenja može se izvesti i iz rezultata dobijenih u ovom radu, a iz kojih se zapaža da je tretman sa PTU negativno uticao na aktivnost DIO1 u tkivu jetre.

Najniža prepartalna koncentracija T<sub>3</sub> kod ogledne grupe junica je ustanovljena sedmog dana tretmana sa PTU (odnosno 13. dan prije teljenja). Nakon toga, iako je vrijednost za koncentraciju T<sub>3</sub> pokazivala izvjesnu varijabilnost, nije se značajno mijenjala sve do momenta teljenja, odnosno prestanka davanja PTU. Sličan trend kretanja koncentracije T<sub>3</sub> ustanovili su i Thrift i saradnici (1999 a,b).

Odmah nakon davanja PTU, počelo je i progresivno smanjenje koncentracije T<sub>4</sub>, koje je trajalo do 1. dana nakon teljenja. Tokom tog perioda ispitivanja, koncentracija

T<sub>4</sub> kod junica ogleadne grupe je bila statistički značajno niža nego kod junica kontrolne grupe. Ovakav rezultat ukazuje na negativan efekat primijenjenog tretmana na aktivnost tireoidne žlijezde. Iako je koncentracija T<sub>4</sub> u krvnom serumu junica ogleadne grupe bila niža nego u kontrolnoj grupi tokom cijelog perioda tretmana, ona se nije spustila ispod vrijednosti od 20 ng/ml (25,74 nmol/L), kada, prema navodima Hopkinsa i saradnika (1975) i Stewarta i saradnika (1994), nastaju znaci kliničke hipotireoze. To znači da je tretman sa PTU doveo do suprimiranja aktivnosti tireoidee, ali ne i do razvoja kliničke hipotireoze. Potencijalni razlog za izostanak razvoja klinički ispoljenog hipotireoznog stanja je dužina tretmana junica ogleadne grupe sa PTU, jer je za sniženje koncentracije T<sub>4</sub> na vrijednosti ispod 20 ng/ml i njenu stabilizaciju na tim vrijednostima potrebno najmanje 28 dana tretmana (Bernal, 1996; Bernal i sar., 1999). Prema Hopkinsu i saradnicima (1975), koncentracija TSH se ne podiže sve dok se koncentracija T<sub>4</sub> ne spusti ispod ove granice.

Primjenom doze PTU od 4mg/kg, a koju smo i mi koristili u našem istraživanju, Elsasser i saradnici (1992) su ostvarili snižavanje koncentracije T<sub>4</sub> u krvi na 30% od fizioloških vrijednosti. Slično ili čak i veće sniženje je postignuto u našem ogledu kod ogleadne grupe tokom tretmana ukoliko se kao fiziološke smatraju vrijednosti dobijene kod kontrolne grupe u istom danu ispitivanja. Taurog (1996) navodi da se efekat PTU na smanjenje koncentracije T<sub>4</sub> postiže direktnim inhibitornim uticajem PTU na jodinaciju tireoglobulina i reakciju vezivanja jodiranih tirozina u molekule tireoidnih hormona na nivou tireoidee. Simultano opadanje koncentracije T<sub>4</sub> i T<sub>3</sub>, ustanovljeno u našem istraživanju može se, prema navodima Thrifta i saradnika (1999b), smatrati indikatorom inhibicije njihove sinteze na nivou tireoidee (Thrift i sar., 1999b). U prilog ovoj tvrdnji su i rezultati drugih istraživača (Bernal, 1996; DeMoraes et al., 1998; Thrift et al., 1999a; Cassar-Malek et al., 2001).

Smanjenje koncentracije T<sub>4</sub> u krvnom serumu ogleadne grupe junica tokom tretmana može se objasniti i sa mogućnošću njegove smanjene konverzije u T<sub>3</sub> u adenohipofizi (zbog suprimirane aktivnosti DIO1), što ima za posljedicu porast lokalne aktivnosti njene DIO2. U tom slučaju, pojačana lokalna sinteza T<sub>3</sub> u adenohipofizi inhibitorno utiče na aktivnost mehanizma negativne povratne sprege u lučenju TRH u hipotalamusu i TSH iz adenohipofize, što dodatno suprimira sintezu i oslobađanje T<sub>4</sub> u sistemsku cirkulaciju. Ovakvo objašnjenje mehanizma djelovanja smanjene

koncentracije  $T_4$  u uslovima hipotireoze indukovane davanjem PTU je u skladu sa rezultatima do kojih su došli Rudas i saradnici (2005).

Na dan teljenja, odnosno dan prestanka tretmana sa PTU, kod junica ogledne grupe koncentracija  $T_4$  je nastavila da se smanjuje, dok je koncentracija  $T_3$  značajno porasla u odnosu na vrijednosti ustanovljene tokom posljednja dva dana prije teljenja. Ovaj nalaz je u skladu sa nalazom Thrifta i saradnika (1999a) koji su ustanovili vraćanje koncentracije  $T_3$  na fiziološke vrijednosti već prvog dana od prestanka tretmana sa PTU. Naime, poluživot PTU u tkivima je vrlo kratak i mjeri se u satima, tako da se aktivnost dejodinaza pojačava brzo, unutar jednog-dva dana od prestanka tretmana PTU.

Za razliku od  $T_3$ , čija je koncentracija porasla istog dana nakon prestanka tretmana, koncentracija  $T_4$  je počela značajno da raste tek trećeg dana nakon prestanka davanja PTU. Iz literature je poznato da do vraćanja aktivnosti tireoidne osovine nakon prestanka davanja PTU, kako na perifernom tako i na centralnom nivou, dolazi tako što se prvo vraća aktivnost dejodinaza, a zatim, nakon izlučivanja PTU akumuliranog u tireoidei, i sinteza i sekrecija tireoidnih hormona (Villar i sar., 2002). Interesantno je da koncentracija  $T_4$ , ne samo da nije porasla odmah nakon prestanka davanja PTU nego je čak nastavila da se smanjuje, i to ispod vrijednosti registrovanih u okviru indukovane hipotireoze. Mogući razlog je njegovo pojačano preuzimanje u tkivima i pretvaranje u metabolički aktivan  $T_3$ , ali i činjenica da se nakon teljenja koncentracija  $T_4$  u krvi krava fiziološki smanjuje (Šamanc i sar., 2010). Koncentracija  $T_3$  se takođe nakon inicijalnog povećanja u momentu teljenja značajno smanjila u naredna dva dana što se takođe može pripisati činjenici da se nakon teljenja koncentracija  $T_3$  u krvi krava fiziološki smanjuje (Šamanc i sar., 2010). Međutim, ne treba izgubiti iz vida činjenicu da se aktivnost DIO1 u jetri nakon teljenja fiziološki značajno smanjuje, tako da je i to mogući razlog smanjene koncentracije  $T_3$  u krvi ogledne grupe odmah nakon teljenja (Pezzi i sar., 2003).

Drugog dana nakon nakon teljenja, odnosno prestanka davanja PTU, došlo je do značajnog porasta koncentracije  $T_4$  u krvi junica ogledne grupe, što je u skladu sa literaturnim podacima (Thrift i sar. 1999 a,b). Koncentracija  $T_4$  je kod tretirane grupe bila značajno viša u odnosu na kontrolnu grupu sve do 5. dana nakon teljenja. Ovo povećano lučenje  $T_4$  je vjerovatno rezultat prestanka inhibitornog djelovanja PTU na

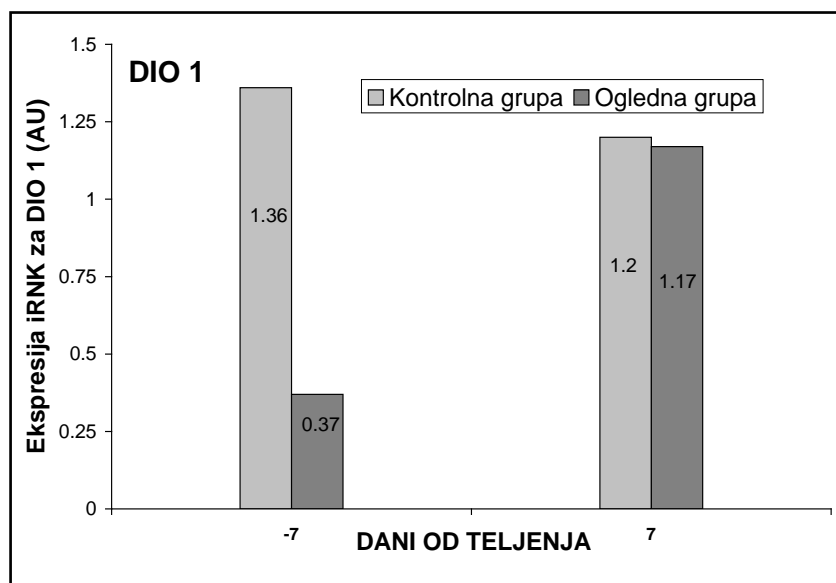
nivou tireoidee (Taurog, 1996; Thrift i sar., 1999b; Villar i sar., 2002). Do značajnog povećanja koncentracije  $T_3$  je došlo tri dana nakon prestanka tretmana sa PTU i on je vjerovatno posljedica porasta koncentracije  $T_4$ , čime je omogućena njegoa pojačana dejodinacija u tkivu jetre.

Iz trenda kretanja koncentracije tireoidnih hormona ustanovljenih u našem istraživanju moguće je zaključiti da je kompenzatorna pojačana aktivnost tireoidee i dejodinaza u perifernim tkivima nakon prestanka tretmana PTU praktično postojala samo tokom prvih pet dana nakon teljenja.

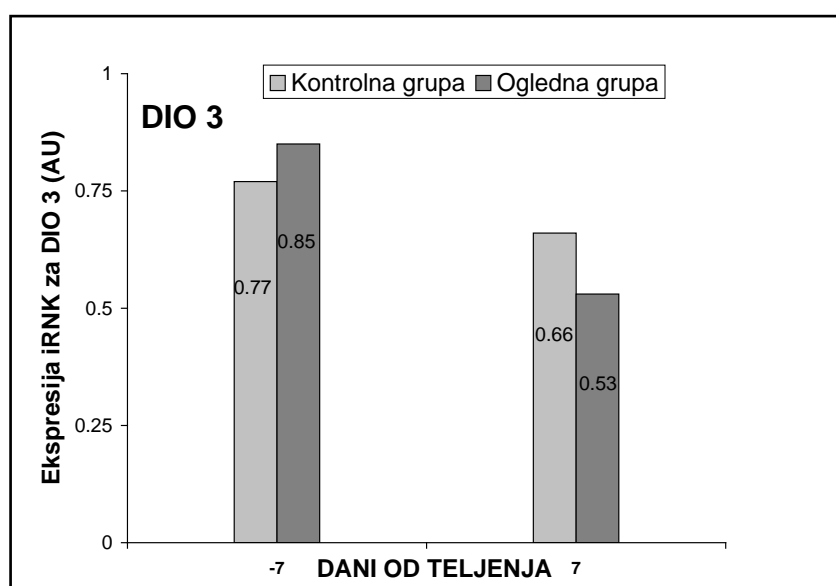
Istraživanja sprovedena na kravama brahman rase (De Moraes i sar., 1998; Thrift i sar., 1999 a,b; Bernal i sar., 1999) ukazuju da nakon prestanka tretmana sa PTU dolazi do privremenog povišenja koncentracije tireoidnih hormona, kao kompenzatornog efekta, koji kod  $T_3$  traje oko dvije nedelje, a kod  $T_4$  oko četiri nedelje, da bi se potom postigle fiziološke vrijednosti. U našem istraživanju je ustanovljen sličan trend kretanja koncentracija tireoidnih hormona, a trajanje perioda privremenog povećanja njihove koncentracije je vjerovatno bilo uslovljeno i fiziološkim statusom ispitivanih životinja. Junice u našem ogledu su bile ne samo na početku laktacije, već i u tranzicionom periodu, odnosno periodu kada i fiziološki nastaju najveća metabolička prestrojavanja (Ingvarlsen i Andersen, 2000). Kao što je iz literature poznato, početak laktacije prate povećane potrebe mliječne žlijezde i perifernih tkiva za metabolički aktivnim  $T_3$  (Pezzi i sar., 2003). To je vjerovatno razlog kome se može pripisati kraće trajanje perioda privremenog povišenja koncentracija tireoidnih hormona nakon prestanka tretmana, ustanovljeno u našem istraživanju, u odnosu na nalaze pomenutih autora.

Da bi se bolje sagledao tireodni status junica u ispitivanom periodu, u našem radu su pored koncentracije tireoidnih hormona ispitivane i aktivnosti dejodinaza kao i njihov međusobni odnos, jer od tog odnosa često zavisi metabolička aktivnost tkiva (Capuco i sar., 2008). Aktivnost dejodinaza je ispitivana 7. dana prije i 7. dana nakon teljenja i prikazana na grafikonima 6.1.3., 6.1.4. i 6.1.5.. Detaljna statistička obrada tih podataka data je u poglavlju Rezultati, a na grafikonima je prikazan trend kretanja koncentracija u cilju lakšeg tumačenja dobijenih rezultata.

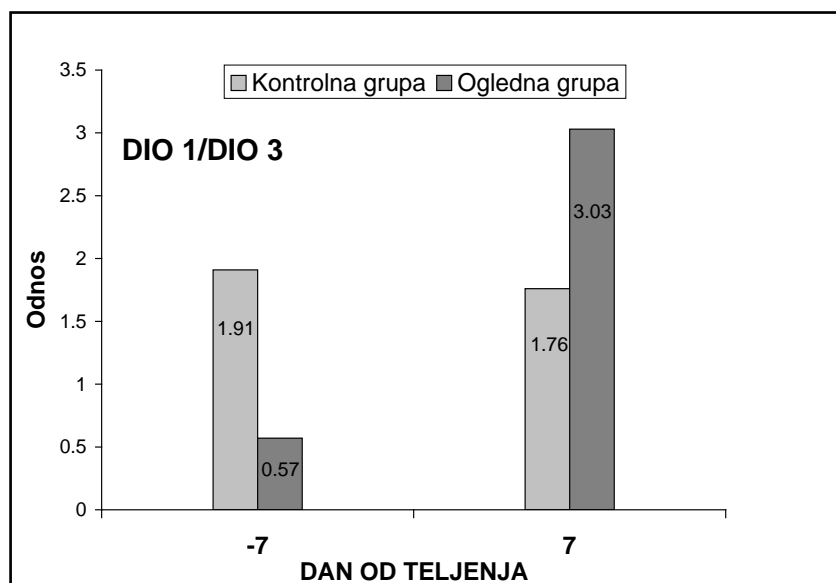




**Grafikon 6.1.3.** Ekspresija iRNK za DIO1 u tkivu jetre kontrolne i ogledne grupe junica



**Grafikon 6.1.4.** Ekspresija iRNK za DIO3 u tkivu jetre kontrolne i ogledne grupe junica



**Grafikon 6.1.5.** Odnos ekspresija iRNK za DIO1 i DIO3 u tkivu jetre kontrolne i ogledne grupe junica

U tkivu jetre je ustanovljena ekspresija iRNK za DIO1 i tragovi ekspresije iRNK za DIO3, dok ekspresija iRNK za DIO2 nije ustanovljena, što je u skladu sa rezultatima drugih autora o tkivnoj distribuciji pojedinih tipova dejodinaza (St Germain, 1994; Capuco i sar., 2008; Gereben i sar., 2008). Nakon prestanka tretmana kod junica ogledne grupe je došlo do statistički značajnog povišenja ekspresije iRNK za DIO1 u tkivu jetre, što ukazuje na prestanak inhibitornog dejstva PTU na ekspresiju iRNK za DIO1. Pojačana ekspresija iRNK za DIO1 u tkivu jetre nakon prestanka tretmana sa PTU se može smatrati kompenzatornim mehanizmom, kojim se povećava koncentracija metabolički aktivnih tireoidnih hormona u sistemskej cirkulaciji. Kod junica kontrolne grupe ustanovljeno je opadanje, mada ne statistički značajno, ekspresije iRNK za DIO1 u tkivu jetre od prepartalnog prema postpartalnom periodu, što je u skladu sa rezultatima Pezzija i saradnika (2003). Tretman sa PTU nije statistički značajno uticao na aktivnost DIO3 u tkivu jetre, koja je kod junica ogledne grupe opadala od prepartalnog prema postpartalnom periodu, dok je kod junica kontrolne grupe ustanovljen trend porasta. Ovakav nalaz kod kontrolne grupe junica je u skladu sa podacima koje navode Capuco i saradnici (2008).

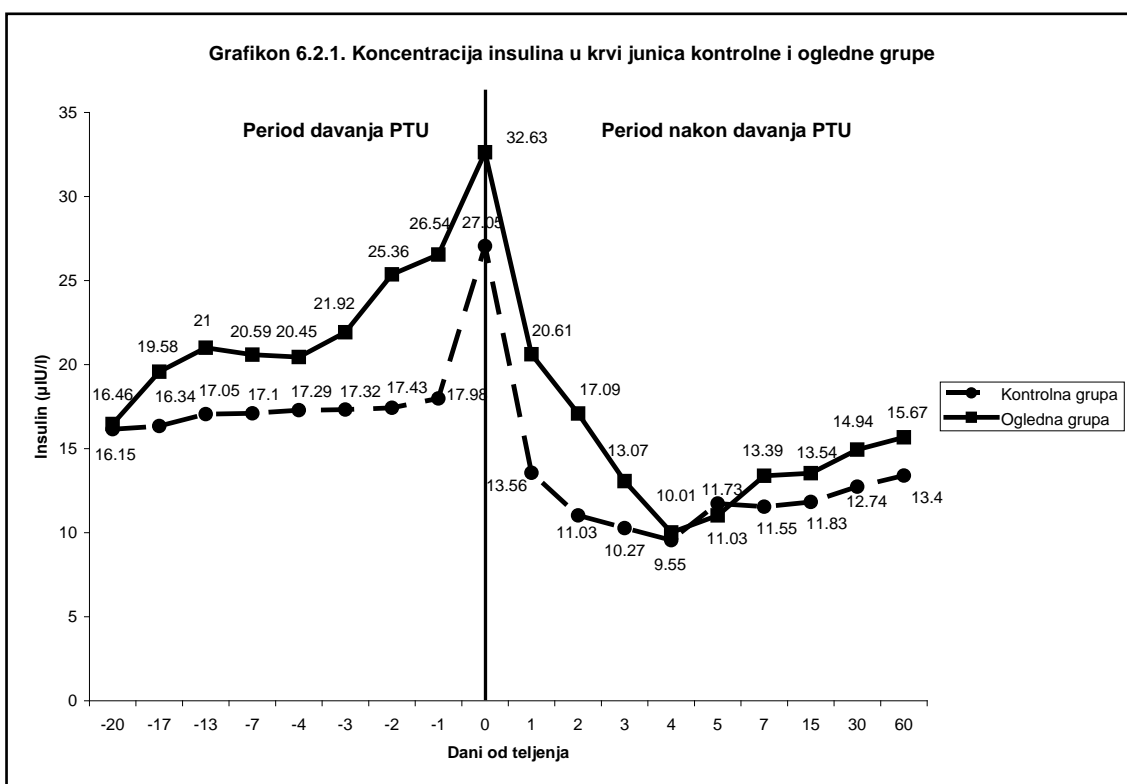
Odnos ekspresija iRNK za DIO1 i DIO3 je indikator stepena lokalne aktivacije, odnosno inaktivacije tireoidnih hormona u nekom tkivu. Povišenje ovog odnosa ukazuje na pojačanu aktivaciju, a smanjenje na inaktivaciju tireoidnih hormona (Bianco i sar., 2002). Kod kontrolne grupe junica se ovaj odnos postpartalno smanjio, dok se kod junica ogledne grupe povećao. Smanjenje ovog odnosa ukazuje na aktivaciju homeoretskog mehanizma podrške laktaciji, koji su opisali Pezzi i saradnici (2003) i Capuco i saradnici (2008). Povišen postpartalni odnos ekspresija iRNK za DIO1/DIO3 (skoro šest puta veći u odnosu na prepartalne vrijednosti), koji je ustanovljen kod junica ogledne grupe, vjerovatno ukazuje na inhibiciju aktivnosti ovog homeoretskog mehanizma. To ima za rezultat povišenje koncentracije aktivnog  $T_3$  u sistemskoj cirkulaciji i intenziviranje metabolizma u tkivu jetre, što možda može da bude povezano sa smanjenim stepenom postpartalnog zamašćenja jetre, utvrđenim kod junica ogledne grupe 7. dana nakon teljenja.

Od petnaestog dana nakon teljenja prema kraju ispitivanog perioda kod obje grupe junica uočljiv je postepeni porast koncentracije  $T_3$ , što ukazuje na stabilizaciju bilansa energije nakon što prođe period u kome se, prema navodima Grummera i saradnika (2010), dešavaju najveće oscilacije energetskog metabolizma. Počevši od 15. dana nakon teljenja vrijednosti koncentracije  $T_3$  su bile niže u krvi ogledne grupe junica u odnosu na kontrolnu, pri čemu je ova razlika bila statistički značajna samo 15. dana nakon teljenja. Pri tome treba istaći da je trend promjene koncentracije  $T_3$ , počevši od 15. dana nakon teljenja do kraja ispitivanog perioda, bio isti kod obje ispitivane grupe junica. Snižanju koncentracije serumskog  $T_3$  u ovom periodu laktacije značajno doprinosi proizvodnja mlijeka. S obzirom da su junice ogledne grupe 30. dana laktacije imale veću proizvodnju mlijeka u odnosu na kontrolnu grupu, moguće je da je kod ogledne grupe postojala povećana potreba za  $T_3$  što je možda dovelo do smanjenja koncentracije  $T_3$  u sistemskoj cirkulaciji. Ovakvo objašnjenje povezanosti koncentracije  $T_3$  u sistemskoj cirkulaciji, odnosno njegovog preuzimanja u tkivu mliječne žlijezde, i proizvodnje mlijeka je u skladu sa rezultatima do kojih su došli Aceves i Valverde (1989) i Pezzi i saradnici (2003). Statistički značajno viša koncentracija  $T_4$  kod junica ogledne grupe, ustanovljena 30. i 60. dana nakon teljenja, je vjerovatno posljedica njihovog povoljnijeg energetskog statusa u odnosu na junice kontrolne grupe. Ovaj

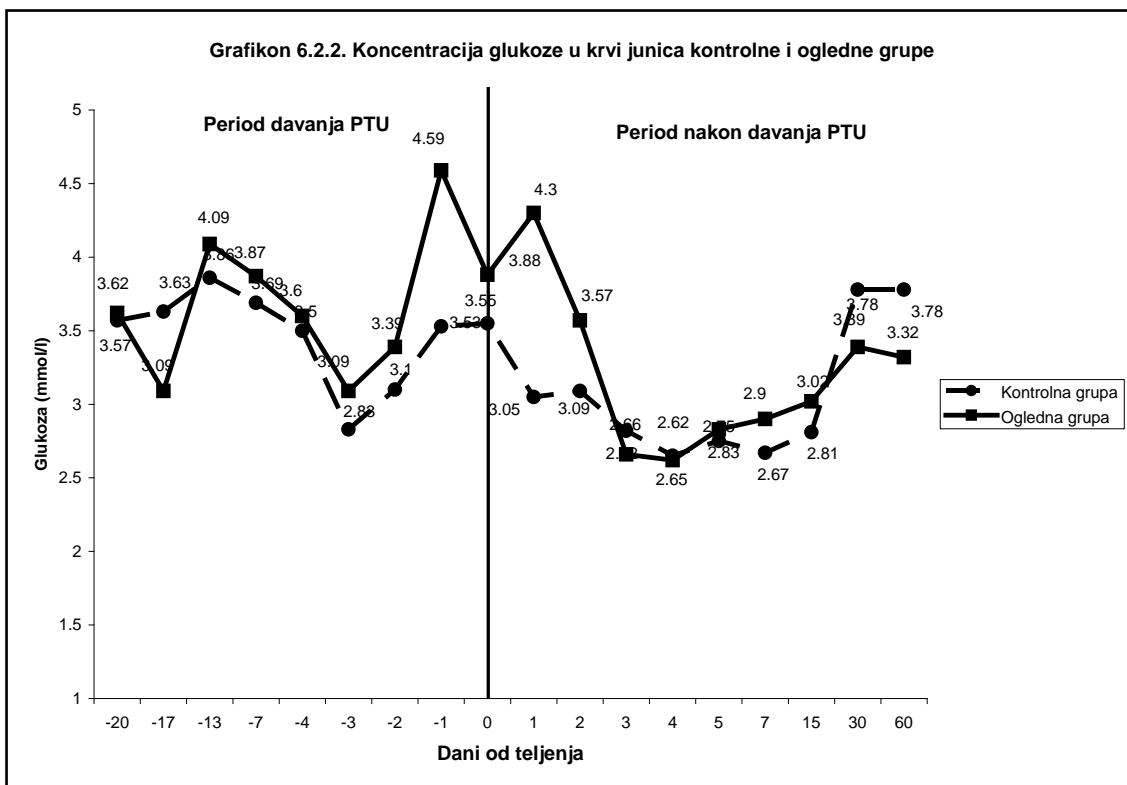
nalaz je u skladu sa podacima o pozitivnoj korelaciji koncentracije tireoidnih hormona i energetskog statusa grla koje navodi Tairats (1997).

## 6.2. Uticaj aplikacije PTU na koncentraciju insulina, glukoze i BHBA

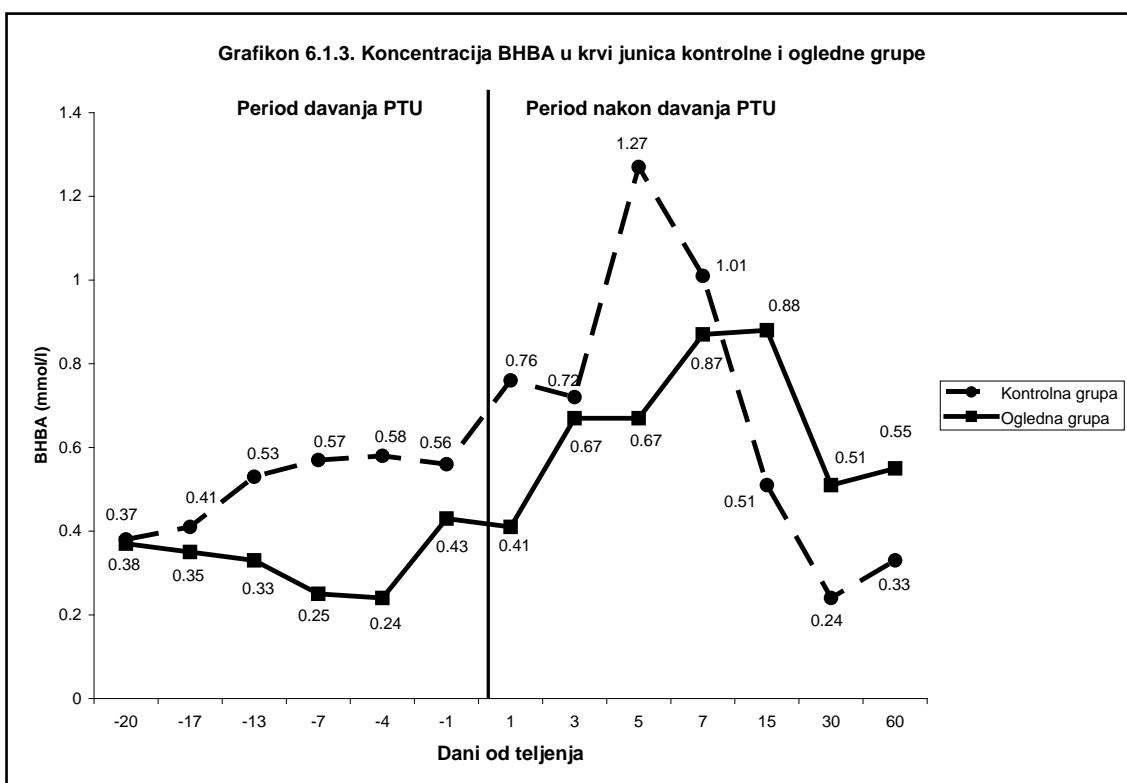
Koncentracije insulina, glukoze i BHBA u krvi junica ogleadne i kontrolne grupe prikazane su na grafikonima 6.2.1., 6.2.2. i 6.2.3. . Detaljna statistička obrada tih podataka data je u poglavlju Rezultati, a na grafikonima je prikazan trend kretanja koncentracija u cilju lakšeg tumačenja dobijenih rezultata.



**Grafikon 6.2.1. Koncentracija insulina u krvi junica kontrolne i ogleadne grupe**

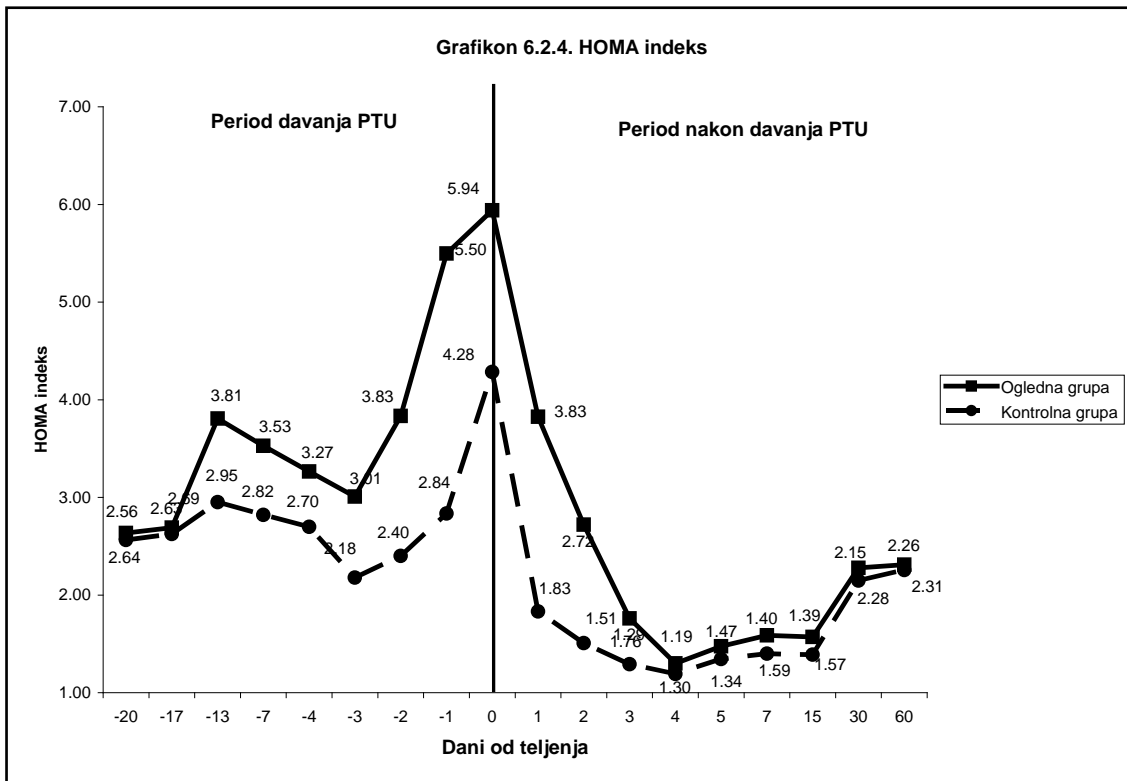


**Grafikon 6.2.2. Koncentracija glukoze u krvi junica kontrolne i ogledne grupe**



**Grafikon 6.2.3. Koncentracija BHBA u krvi junica kontrolne i ogledne grupe**

Tretman sa PTU je doveo do značajnog povišenja koncentracije insulina u krvi ogleđne grupe junica. Naime, insulinemija je kod ogleđne grupe junica tokom cijelog prepartalnog perioda bila statistički značajno viša u odnosu na vrijednost utvrđenu prije početka tretmana. Ovakav trend nije ustanovljen kod kontrolne grupe. Koncentracija insulina u krvi junica ogleđne grupe je, počevši od 17. dana prije do 1. dana nakon teljenja bila viša u odnosu na vrijednosti utvrđene kod kontrolne grupe junica, s tim da je ova razlika bila statistički značajna samo u pojedinim periodima ispitivanja. Moguće objašnjenje visoke prepartalne koncentracije insulina kod ogleđne grupe junica tokom tretmana sa PTU je smanjena razgradnja insulina u jetri zbog snižene koncentracije  $T_3$  u cirkulaciji (Bernal i de Groot, 1980). Dodatni razlog za prepartalno povišenje koncentracije insulina kod junica ogleđne grupe može biti i povišena koncentracija glukoze u krvi, koja preko mehanizma negativne povratne sprege stimuliše lučenje insulina (Jaakson i sar., 2010) i njegov anabolički efekat na sintezu glikogena u tkivu jetre (Blatt i Kim, 1971). Naime, počevši od sedmog dana nakon davanja PTU pa do 2. dana nakon teljenja, glikemija je kod ogleđne grupe junica bila viša nego kod kontrolne, ali ova razlika nije bila statistički značajna do 2. dana prije teljenja. Nalaz povišene glikemije kod ogleđne grupe junica je vjerovatno posljedica smanjenja bazalnog metabolizma i smanjene utilizacije glukoze u perifernim tkivima, što je u skladu sa navodima Guytona i Halla (2006). Bez obzira na visoku koncentraciju insulina kod ogleđne grupe junica, glikemija je tokom prepartalnog perioda ostala u opsegu fizioloških vrijednosti. Kada se izračuna vrijednost HOMA indeksa, koja se, prema zaključcima do kojih su došli Wallace i saradnici (2004), može smatrati indikatorom stepena insulinske rezistencije, jasno se zapaža da je senzitivnost perifernih tkiva na insulin junica ogleđne grupe bila smanjena, počevši od sedmog dana nakon početka davanja PTU, pa sve do kraja ispitivanog perioda (Grafikon 6.2.4.).



**Grafikon 6.2.4.** Vrijednost HOMA indeksa kod kontrolne i ogledne grupe junica

Ovaj rezultat je u skladu sa podacima iz literature koji ukazuju da je hipotireoza često udružena sa insulinskom rezistencijom (Kunal i sar., 2012). Pri tome ne treba zanemariti činjenicu da je trećeg dana od početka tretmana sa PTU kod ogledne grupe junica došlo do značajnog smanjenja glikemije, koje je vjerovatno posljedica značajnog povećanja koncentracije insulina u periodu kada se insulinska rezistencija još nije razvila, što je dovelo do pojačanog preuzimanja glukoze u perifernim tkivima. Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatima do kojih su došli Sano i saradnici (1993). Visoka koncentracija insulina kod junica ogledne grupe tokom prepartalnog perioda je inhibitorno uticala na procese lipomobilizacije, zbog čega nije došlo do značajnijeg povišenja koncentracije slobodnih masnih kiselina u krvi i ketogeneze. Na ovo ukazuju i niske koncentracije BHBA, koje se nalaze ispod kritične granice za nastanak poremećaja zdravlja od 1 mmol/l koju navode Ospina i saradnici (2010b) i Seifi i saradnici (2011).

Održavanje visoke koncentracije insulina u krvi junica ogledne grupe u prva dva dana nakon teljenja, odnosno po prestanku tretmana sa PTU se može objasniti uticajem glikemije, koja se u uskom periodu oko teljenja održavala na statistički značajno višem nivou u odnosu na junice kontrolne grupe. Visoka glikemija je vjerovatno nastala kao posljedica aktivacije hormonskih sistema, koji u uslovima stresa mobilišu značajne količine glikogena deponovanog u jetri tokom prepartalnog perioda. Drugim riječima, junice ogledne grupe su se tokom ranog postpartalnog perioda nalazile u stanju pozitivnog bilansa energije. U prilog ovoj tvrdnji su i rezultati do kojih su došli Hayirli i saradnici (2002) i Hayirli (2006), koji kao indikatore pozitivnog bilansa energije označavaju visoke koncentracije insulina i glukoze i nisku koncentraciju BHBA.

Junice ogledne grupe su u prvim danima nakon teljenja imale nižu mliječnost u odnosu na junice kontrolne grupe, i njihova mliječna žlijezda je preuzimala manju količinu glukoze iz krvi i iskorištavala je za sintezu laktoze, što je vjerovatno imalo pozitivan uticaj na očuvanje glikemije. Nasuprot njima, kod junica kontrolne grupe preuzimanje značajne količine glukoze iz krvi za sintezu laktoze i energetske potrebe mliječne žlijezde negativno je uticalo na očuvanje glikemije u prvim danima nakon teljenja, što je u skladu sa rezultatima do kojih su došli Eslamizad i saradnici (2010). Na očuvanje glikemije kod junica kontrolne grupe vjerovatno je negativno uticalo i pojačano preuzimanje glukoze u hepatocitima, nastalo kao posljedica potrebe za sintezu oksal-acetata, neophodnog za beta-oksidaciju slobodnih masnih kiselina mobilisanih iz tjelesnih depoa. Ovaj efekat kod junica ogledne grupe bio je izražen u značajno manjoj mjeri, na šta ukazuje i koncentracija BHBA ustanovljena kod ogledne, odnosno kontrolne grupe junica. Ovaj nalaz je u skladu sa rezultatima do kojih su došli Janovick i saradnici (2011).

Očuvanje visoke koncentracije glukoze unutar prva dva dana nakon teljenja može se objasniti i deponovanjem značajne količine glikogena u jetri tokom perioda prepartalne hipotireoze (Chandra i Mukherjee, 1985), zbog čega su junice ogledne grupe bile u mogućnosti da ga postpartalno iskoriste za potrebe energetskog metabolizma mliječne žlijezde i drugih perifernih tkiva, uz očuvanje visoke glikemije. Naime, indukovana hipotireoza je dovela do smanjenja bazalnog metabolizma, sa posljedičnim anaboličkim efektom (Squires, 2003), koji je dodatno potenciran visokim nivoom insulina. To je zajedno rezultovalo pojačanom sintezom i deponovanjem



glikogena u jetri i drugim tkivima (Ichihara i sar., 1982). U prilog ovoj tvrdnji govori i nalaz velike količine glikogena u uzorcima tkiva jetre ogledne grupe junica uzetim prepartalno.

Počevši od 3. dana nakon teljenja do kraja ispitivanog perioda, koncentracija insulina u krvnom serumu junica ogledne grupe nije se statistički značajno razlikovala u odnosu na vrijednosti ustanovljene kod junica kontrolne grupe, iako je sve vrijeme bila viša. Kod obje grupe junica najniža koncentracija insulina je ustanovljena 4. dana nakon teljenja, što je u skladu sa rezultatima do kojih su došli Doepel i saradnici (2002). Ovi autori su tokom peripartalnog perioda ustanovili smanjenje koncentracije insulina, koje je 4. dana nakon teljenja dostiglo vrijednost od 6  $\mu$ IU/mL. Trend promjena insulinemije od 3. dana nakon teljenja kod ogledne grupe bio je usaglašen sa koncentracijom glukoze. Naime, koncentracija glukoze se značajno smanjila 3. dana nakon teljenja, najvjerovatnije pod uticajem visoke koncentracije  $T_3$  u tom periodu, koja je uslovlila njenu pojačanu utilizaciju u perifernim tkivima. U prilog ovoj tvrdnji govore rezultati do kojih su došli Sugden i saradnici (1990) i Teixeira i saradnici (2012). Tome svakako treba pridodati i preuzimanje značajne količine glukoze od strane mliječne žlijezde i njeno iskorištavanje za sintezu laktoze (Bell i Bauman, 1997; Cant i sar., 2002). Od 4. dana nakon teljenja koncentracija glukoze kod junica ogledne grupe je postepeno rasla prema kraju ispitivanog perioda, i, iako je statistička značajnost razlika izostala (sa izuzetkom 15. dana nakon teljenja kada je ustanovljena statistički značajna razlika na nivou od  $p < 0,05$ ), bila je na višem nivou u odnosu na junice kontrolne grupe sve do 30. dana nakon teljenja. Nalaz stabilne i više glikemije i insulinemije kod junica ogledne grupe tokom postpartalnog perioda, zajedno sa vrijednostima koncentracije BHBA, ukazuje na njihov povoljniji bilans energije u odnosu na junice kontrolne grupe. Do sličnih zaključaka došli su i drugi autori (Holtenius i sar., 1993; Van den Top i sar. 1995; Gross i sar., 2011). Pored inhibicije lipomobilizacije, visoka koncentracija glukoze u krvi omogućila je efikasnu i potpunu beta-oksidaciju masnih kiselina u hepatocitima junica ogledne grupe, u kojima nije došlo do razvoja zamašćenja, a njihova glukoneogena i uopšte sintetska sposobnost ostala je očuvana. Na vezu visoke glikemije sa stepenom zamašćenja i očuvanjem funkcionalnog stanja jetre ukazuju i drugi autori (Strang i sar., 1998; Murondoti i sar., 2004). Istovremeno, kod ogledne grupe junica potreba za glukoneogenezom iz neugljenohidratnih jedinjenja, koja

redovno postoji kod životinja koje su u stanju negativnog bilansa energije, bila je smanjena. Smanjenje ove potrebe pozitivno je uticalo na očuvanje koncentracije albumina i ukupnih proteina, a negativno na koncentraciju BHBA i NEFA, što potvrđuju i rezultati do kojih su došli Xia i saradnici (2012).

Tridesetog i 60. dana nakon teljenja glikemija i insulinemija su značajno porasle kod obje grupe junica, pri čemu su apsolutne vrijednosti bile više kod ogledne grupe. Ova dva parametra se smatraju indikatorima stabilizacije energetske bilansa (Hayirli i sar., 2011). U skladu sa time, vrijednosti dobijene kod junica ogledne grupe ukazuju na njihov povoljniji energetski status u odnosu na junice kontrolne grupe.

Posmatranjem samo rezultata za koncentraciju BHBA zapaža se da je koncentracija BHBA u krvi junica ogledne grupe bila niža u odnosu na junice kontrolne grupe od početka ispitivanog perioda do 7. dana nakon teljenja, što ukazuje na povoljniji energetski bilans kod ove grupe junica, kako prepartalno, tako i tokom ranog postpartalnog perioda. U prepartalnom periodu, ovaj nalaz je najvjerovatnije posljedica smanjenja bazalnog metabolizma nastalog kao rezultat indukcije hipotireoze, zbog čega se energetske potrebe organizma smanjuju. Snižavanje koncentracije tireoidnih hormona, posebno  $T_3$ , nakon tretmana sa PTU inhibitorno je uticalo na aktivnost mitohondrija i potrošnju kiseonika u njima, zbog čega je intenzitet oksidativnih procesa u hepatocitima bio smanjen. Ovaj nalaz je u skladu sa rezultatima do koji su došli Wrutniak-Cabello i saradnici (2001). Visoka glikemija i značajne količine glikogena deponovanog u jetri smanjile su potrebu organizma za razlaganjem masti kao izvora energije, kako prepartalno, tako i postpartalno, što je, zajedno sa visokom insulinemijom, inhibitorno uticalo na postpartalnu lipomobilizaciju i omogućilo efikasniju utilizaciju mobilisanih masnih kiselina u jetri. Do sličnih zaključaka došli su i Liu i saradnici (2010) i Lomander i saradnici (2012).

Nagli porast koncentracije BHBA kod junica ogledne grupe, ustanovljen 3. dana nakon teljenja, može se dovesti u vezu sa intenziviranjem metaboličkih procesa kao posljedice kompenzatorne pojačane aktivnosti tireoidee nakon prestanka tretmana sa PTU, koja je pored ubrzanja metaboličkih procesa, vjerovatno imala za posledicu i povećanje broja i veličine mitohondrija u hepatocitima, kao i njihovih krista, na šta ukazuju i rezultati do kojih su došli Goffart i Wiesner (2003) i Weitzel i saradnici

(2003). U prilog ovoj tvrdnji govori i nalaz naglog opadanja glikemije i povišenje koncentracije tireoidnih hormona, prvenstveno T<sub>3</sub>, ustanovljeno u tom periodu.

Uočljivo je da se koncentracija BHBA kod junica ogledne grupe, i pored statistički značajnog povišenja u postpartalnom periodu, održavala ispod granice od 1 mmol/L, što nije bio slučaj kod junica kontrolne grupe. Ovaj nalaz ukazuje na očuvanu funkcionalnu sposobnost hepatocita kod junica ogledne grupe, koja im zajedno sa visokim sadržajem glikogena i povišenom koncentracijom tireoidnih hormona omogućava potpuniju beta-oksidaciju masnih kiselina koje pristižu u jetru iz tjelesnih depoa. U prilog tome govore i rezultati do kojih su došli drugi autori (van Kneysel i sar., 2007a; Kessel i sar., 2008; LeBlanc, 2010; Ospina i sar., 2010b; González i sar., 2011).

Statistički značajno više koncentracije BHBA kod junica ogledne grupe u odnosu na kontrolnu, koje su ustanovljene 15., 30. i 60. dana nakon teljenja ukazuju da je lipomobilizacija umjerenog stepena postojala i kod ove grupe junica, ali je bila odložena. Odlaganje lipomobilizacije i smanjenje njenog intenziteta kod junica ogledne grupe vjerovatno su im omogućili da lakše prebrode kritični period adaptacije na povećane potrebe u energiji tokom početne faze laktacije, kao i efikasnije i racionalnije iskorištavanje tjelesnih rezervi energije. Smanjenje intenziteta lipomobilizacije je, vjerovatno, nastalo i kao rezultat preusmjeravanja energetskeg metabolizma junica ogledne grupe na korištenje glikogena kao izvora energije, zbog čega jetra trpi manje opterećenje mobilisanim mastima. U prilog ovoj tvrdnji su i rezultati do kojih su došli van Kneysel i saradnici (2007b). Istovremeno, smanjena količina slobodnih masnih kiselina u krvi, zajedno sa visokom koncentracijom insulina, pozitivno utiče na aktivnost centra za glad (Ingvarsen i Andersen, 2000), što potencira unos suve materije hrane i dodatno popravljaja energetske bilans organizma.

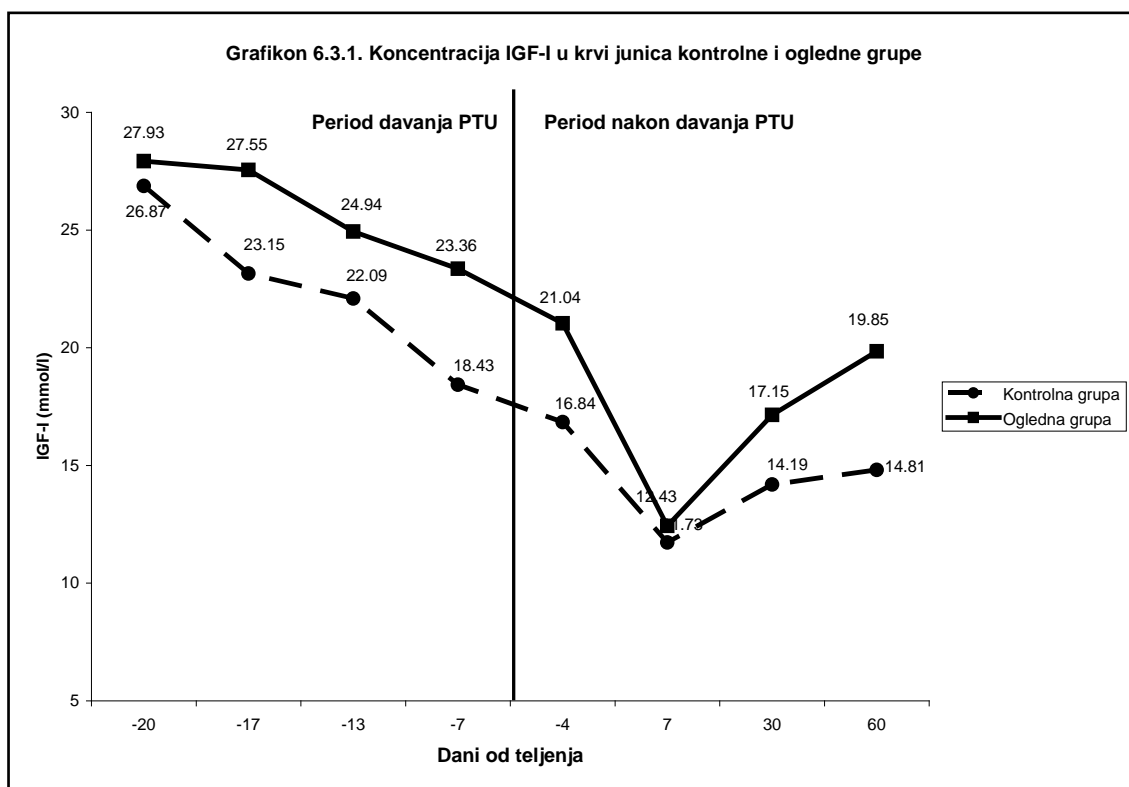
U tom smislu, mogućnost odlaganja početka lipomobilizacije, smanjenja njenog intenziteta, kao i preusmjeravanja energetskeg metabolizma na korišćenje glikogena kao izvora energije, sa ciljem upravljanja procesima adaptacije na novonastale povećane potrebe u energiji, otvara novo polje za istraživače u oblasti metabolizma visokomliječnih krava.

Očuvanje sintetske sposobnosti hepatocita pozitivno utiče na sintezu triglicerida i lipoproteina, u koje se ugrađuju masne kiseline i tako transportuju do perifernih tkiva, prvenstveno mliječne žlijezde, u kojima će se iskoristiti kao izvor energije (Mazur i sar.,

1992; Grummer, 1993; Katoh, 2002; Bernabucci i sar., 2004; Van den Top i sar., 2005). Takođe, očuvanje sintetske sposobnosti hepatocita se ogleda u održavanju koncentracije proteina krvi, prije svega albumina, unutar fizioloških granica, kao i u sposobnosti detoksikacije različitih potencijalno toksičnih jedinjenja (Muylle i sar., 1990). U prilog ovoj tvrdnji je nalaz da akumulacija masti u hepatocitima smanjuje njihovu sposobnost za sintezu uree i do 40%, što ima za posljedicu prelazak značajne količine amonijaka u cirkulaciju i nastanak brojnih metaboličkih poremećaja (Strang i sar., 1998), između ostalog i hepatičke encefalopatije.

### 6.3. Uticaj aplikacije PTU na IGF sistem

Koncentracija IGF-I u krvi junica prikazana je na grafikonu 6.3.1. Detaljna statistička obrada tih podataka data je u poglavlju Rezultati, a na grafikonima je prikazan trend kretanja koncentracija u cilju lakšeg tumačenja dobijenih rezultata.



**Grafikon 6.3.1.** Koncentracija IGF-I u krvi junica kontrolne i ogledne grupe

Koncentracija IGF-I u krvi je u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijama glukoze i insulina, OTK i tjelesnom masom krava, a u negativnoj sa koncentracijama NEFA i ketonskih tijela (Rutter i sar, 1989; Nishimura i sar., 2000; Zulu i sar., 2002b). Ovakav odnos sa indikatorima energetskeg statusa govori u prilog pozitivnoj korelaciji između koncentracije IGF-I i energetskeg bilansa jedinice, što potvrđuju i nalazi do kojih su došli Ginger i saradnici (1997) i Beam i Butler (1998, 1999). Razlika u koncentraciji IGF-I između junica kontrolne i ogledne grupe utvrđena u ovom istraživanju, posebno u postpartalnom periodu, se može protumačiti razlikama u energetskeg bilansu. Naime, pokazatelji energetskeg statusa ukazuju da su se junice ogledne grupe tokom cijelog perioda ispitivanja nalazile u stanju povoljnijeg bilansa energije u odnosu na junice kontrolne grupe, što je vjerovatno doprinijelo stimulaciji sinteze i sekrecije IGF-I u jetri. Tome treba pridodati i činjenicu da je stepen postpartalnog zamašćenja jetre kod junica ogledne grupe bio statistički značajno niži u odnosu na kontrolnu, te da je za očekivati da je sintetska sposobnost hepatocita junica ogledne grupe bila veća u odnosu na kontrolnu grupu, što je omogućilo intenzivniju sintezu IGF-I. Na postojanje negativne korelacije između stepena zamašćenja jetre i koncentracije IGF-I u krvi krava tokom postpartalnog perioda ukazuju Bobe i saradnici (2004) i Gross i saradnici (2011). U uzorcima tkiva jetre uzetim nakon teljenja kod junica ogledne grupe uočena je pojava mladih hepatocita, te je za očekivati da je sposobnost jetre ovih junica za sintezu i sekreciju IGF-I veća u odnosu na junice kontrolne grupe.

Goya i saradnici (1999) su ustanovili da glukoza, u obliku glukozo-6-fosfata, ima pozitivan uticaj na sintezu i sekreciju IGF-I u fetalnim hepatocitima pacova u *in vitro* uslovima. Zaključci ovih autora mogu se primijeniti i na rezultate našeg istraživanja, te se visoka koncentracija IGF-I kod ogledne grupe junica, između ostalog, može objasniti i uticajem više glikemije u odnosu na junice kontrolne grupe.

Na očuvanje povoljnijeg energetskeg statusa junica ogledne u odnosu na junice kontrolne grupe i pored više mliječnosti ukazuje i nalaz statistički značajno više koncentracije IGF-I ustanovljene 30. i 60. dana nakon teljenja. Nalaz više koncentracije BHBA i niže glikemije kod junica ogledne grupe, uz očuvanje više koncentracije insulina vjerovatno je posljedica većeg metaboličkog opterećenja njihovog organizma zbog proizvodnje veće količine mlijeka (ustanovljene na kontrolama mliječnosti 30. i

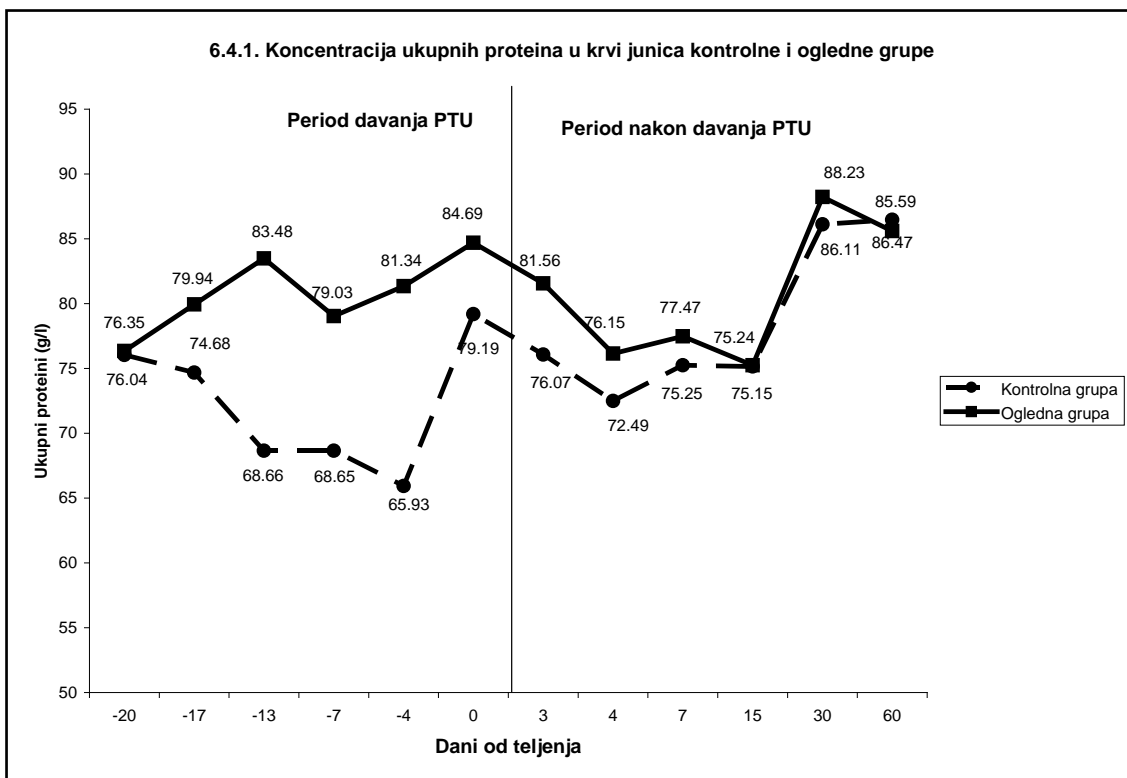
60. dana laktacije), pri čemu je njihov energetska bilans ipak ostao povoljniji u odnosu na junice kontrolne grupe.

Pored uticaja na sintezu i sekreciju IGF-I u jetri i rezistenciju perifernih tkiva na somatotropni hormon, energetska status životinje na IGF sistem utiče i preko IGFBP. Naime, tokom perioda NEB ustanovljeno je opadanje relativne zastupljenosti IGFBP-3 i povećanje relativne zastupljenosti IGFBP-1 i IGFBP-2, kao formi koji inhibiraju oslobađanje IGF-I u perifernim tkivima (Clemmons i sar., 1989; McCusker i sar., 1991; Gallaher i sar., 1992). Smanjenje relativne zastupljenosti IGFBP-3, kao glavnog nosača, može se protumačiti kao pokušaj organizma da poveća dostupnost preostalog IGF-I perifernim tkivima (Zulu i sar., 2002b). Rezultati našeg istraživanja su u skladu sa navodima pomenutih autora, jer je kod junica ogledne grupe relativna zastupljenost IGFBP-2 i IGFBP-4 tokom ispitivanog perioda blago porasla, dok je kod junica kontrolne grupe ustanovljen statistički značajan porast relativne zastupljenosti ova dva proteina nosača. Relativna zastupljenost IGFBP-3 kod junica ogledne grupe je tokom ispitivanog perioda rasla, dok je kod junica kontrolne grupe opadala, što ukazuje na izrazit uticaj povoljnog energetska statusa na očuvanje relativne zastupljenosti IGFBP-3 u odnosu na ostale proteine nosače IGF-I. Do sličnih zaključaka o povezanosti energetska statusa i relativne zastupljenosti pojedinih proteina nosača IGF došli su i Gross i saradnici (2011).

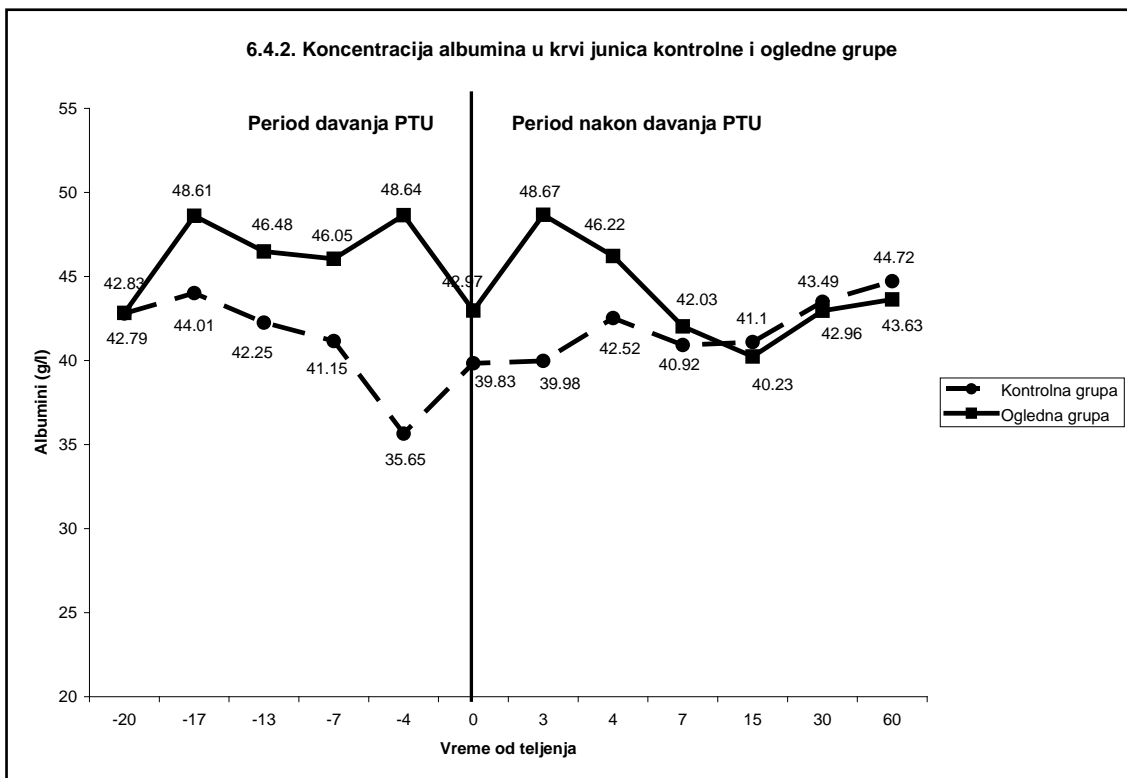
Nikolić i saradnici (2001) navode da nalaz izostanka korelacije koncentracija trijodtironina i IGF-I u postpartalnom periodu, analogno izostanku postojanja prepartalne korelacije između koncentracije tiroksina i IGF-I, ukazuje na izmjenu u regulatornim mehanizmima koji kontrolišu prelazak ovih hormona iz serumskog pula (rezerve) u tkiva. Pri tome se pretpostavlja da nutritivni status ima sličan uticaj na sintezu i sekreciju IGF-I i dejodinaciju tiroksina u jetri.

#### **6.4. Uticaj aplikacije PTU na koncentraciju ukupnih proteina i albumina**

Koncentracije ukupnih proteina i albumina u krvi junica ogledne i kontrolne grupe prikazane su na grafikonima 6.4.1 i 6.4.2.. Detaljna statistička obrada tih podataka data je u poglavlju Rezultati, a na grafikonima je prikazan trend kretanja njihovih koncentracija tokom ispitivanog perioda u cilju lakšeg tumačenja dobijenih rezultata.



**Grafikon 6.4.1.** Koncentracija ukupnih proteina u krvi junica kontrolne i ogledne grupe



**Grafikon 6.4.1.** Koncentracija albumina u krvi junica kontrolne i ogledne grupe

Koncentracija ukupnih proteina i albumina u krvnom serumu junica kontrolne grupe je bila na gornjoj granici fizioloških vrijednosti tokom cijelog ispitivanog perioda, a u pojedinim danima je dostizala vrijednosti koje se u odnosu na referentne vrijednosti (67,40-74,60 g/L, odnosno 30,30-35,50 g/L, prema Kaneko i sar., 2008) mogu tumačiti kao hiperproteinemija, odnosno hiperalbuminemija. Ovaj nalaz je u skladu sa rezultatima istraživanja koje su, na istoj farmi na kojoj je sprovedeno ovo istraživanje, sproveli Šamanc i saradnici (2011). Statistički značajno viša koncentracija ukupnih proteina u krvnom serumu junica ogledne grupe, koja je postojala u periodu od 13. do 4. dana prije teljenja, a zatim njihove više koncentracije (iako nije ustanovljena statistički značajna razlika) koje su se održavale sve do 30. dana nakon teljenja ukazuju na pozitivan uticaj tretmana sa PTU na koncentraciju ukupnih proteina. Moguće objašnjenje ovog efekta je smanjena razgradnja proteina krvi, prije svega albumina, odnosno smanjeno iskorišćavanje aminokiselina u procesu glukoneogeneze tokom cijelog ispitivanog perioda, zbog čega je poluživot proteina u cirkulaciji produžen u odnosu na junice kontrolne grupe. Na vezu poluživota proteina krvi i korištenja aminokiselina u procesima glukoneogeneze ukazuju i nalazi drugih autora (Bell, 1995; Bell i sar., 2000; Kuhla i sar., 2011). Na smanjeno iskorištavanje proteina krvi, njihovu pojačanu sintezu i deponovanje u tkivima junica ogledne grupe tokom prepartalnog perioda vjerovatno je uticalo i smanjenje intenziteta bazalnog metabolizma nastalo kao posljedica indukcije hipotireoze, kao i visoka insulinemija, odnosno njen anabolički efekat. Na anabolički efekat hipotireoze, odnosno visoke insulinemije, ukazuju i rezultati do kojih su došli Rumsey i saradnici (1983b) i Hopgood i Ballard (1979).

Energetski bilans je kod junica ogledne grupe tokom cijelog ispitivanog perioda bio povoljniji u odnosu na junice kontrolne grupe, što je smanjilo potrebu za korišćenjem aminokiselina kao energetske prekursora, jer je njihov organizam svoje potrebe u energiji zadovoljavao razgradnjom glukoze mobilisane iz depoa glikogena u jetri, a manjim dijelom iz masnih kiselina mobilisanih iz tjelesnih depoa. Na smanjeno iskorištavanje aminokiselina u procesu glukoneogeneze u uslovima povoljnog bilansa energije ukazuju i rezultati do kojih su došli van Kneysel i saradnici (2007b) i Kuhla i saradnici (2009). U prilog tome govori i činjenica da je glikemija kod junica ogledne grupe bila viša u odnosu na kontrolnu od početka tretmana sve do 3. dana nakon teljenja, a zatim ponovo u periodu od 5. do 15. dana nakon teljenja.

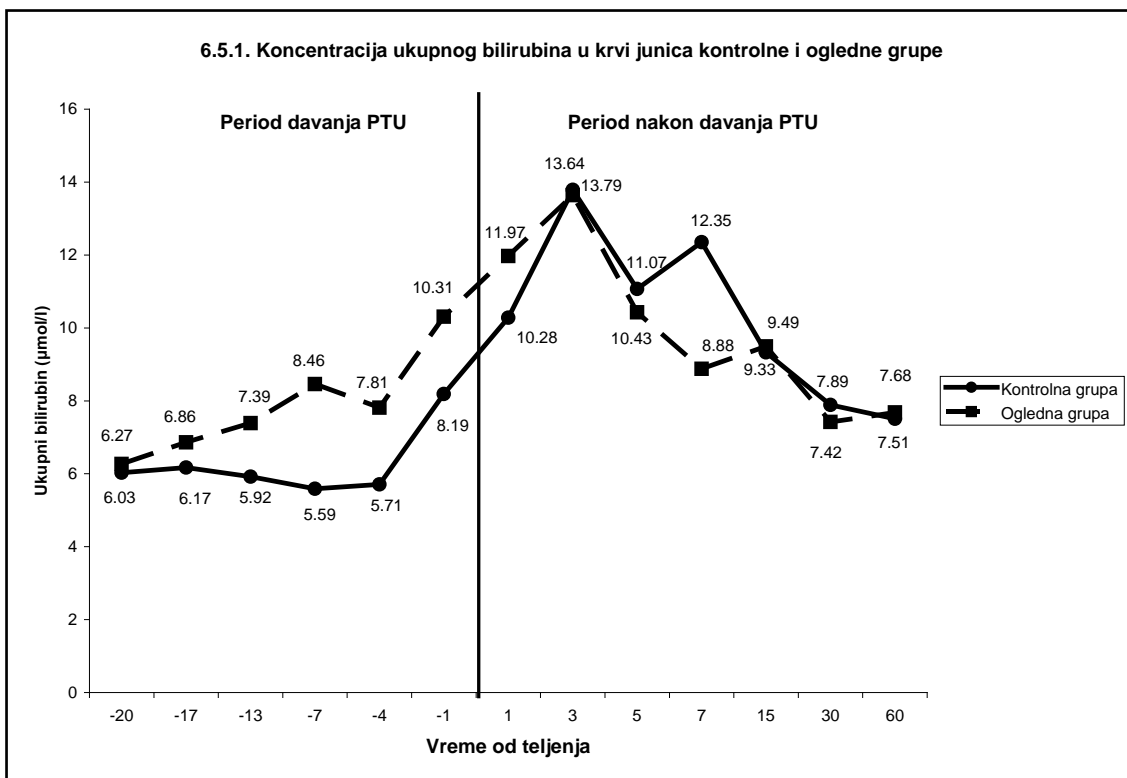


Visoka glikemija je vjerovatno obezbijedila hepatocitima (ali i drugim tkivima, prije svega mliječnoj žlijezdi) dovoljne količine energije za anaboličke procese, između ostalog i sintezu proteina (Kuhla i sar., 2011). Anabolički efekti povišene koncentracije insulina i IGF-I tokom cijelog ispitivanog perioda potencirali su sintetsku sposobnost hepatocita kod junica ogledne grupe, koja je i postpartalno ostala na visokom nivou zbog izostanka zamašćenja jetre, koje je postojalo kod junica kontrolne grupe. Do sličnih zaključaka došli su i Strang i saradnici (1998) i Haiyrli (2006). Tome treba dodati i pozitivan uticaj povišene koncentracije tireoidnih hormona na sintezu proteina u uslovima adekvatne snabdjevenosti energijom, odnosno njihov anabolički efekat koji navode Guyton i Hall (2006).

Razlike u vrijednostima koncentracije ukupnih proteina, odnosno albumina, koje su u postpartalnom periodu postojale između junica ogledne i kontrolne grupe mogu se dovesti u vezu i sa proizvodnjom mlijeka, koja je u prvim danima laktacije bila nešto viša kod junica kontrolne grupe, zbog čega je i količina aminokiselina preuzetih iz krvi za sintezu proteina mlijeka u ovom periodu kod ove grupe junica bila nešto veća u odnosu na oglednu. Do sličnih zaključaka došli su i Delamaire i Guinard-Flament (2006). Ovu tvrdnju potvrđuje i nalaz u kasnijoj fazi laktacije (od 30. dana), kada junice ogledne grupe postižu višu mliječnost, jer se njihova koncentracija ukupnih proteina i albumina u tom periodu smanjuje u odnosu na vrijednosti ustanovljene kod junica kontrolne grupe.

## **6.5. Uticaj aplikacije PTU na koncentraciju ukupnog bilirubina**

Koncentracija ukupnog bilirubina u krvi junica ogledne i kontrolne grupe prikazana je na grafikonu 6.5.1. Detaljna statistička obrada tih podataka data je u poglavlju Rezultati, a na grafikonima je prikazan trend kretanja njegove koncentracije tokom ispitivanog perioda u cilju lakšeg tumačenja dobijenih rezultata.



**Grafikon 6.5.1.** Koncentracija ukupnog bilirubina u krvi junica kontrolne i ogledne grupe

Postepeno povišenje koncentracije bilirubina u krvnom serumu junica ogledne grupe, nastalo tokom prepartalnog tretmana sa PTU može se dovesti u vezu sa smanjenjem intenziteta metaboličke aktivnosti hepatocita, odnosno njihovih mitohondrija, nastalim zbog indukcije hipotireoze. U prilog tome govore i rezultati do kojih su došli drugi autori (Kapp i sar., 1979; Wrutniak-Cabello i sar., 2001; Weitzel i sar., 2003). Kao posljedica smanjene metaboličke aktivnosti hepatocita i smanjene potrošnje kiseonika, proces metaboličke transformacije bilirubina i njegovog vezivanja za glukuronsku kiselinu (iako je sadržaj glikogena u jetri bio povećan) bio je djelimično inhibiran što je vjerovatno dovelo do prelaska veće količine nekonjugovanog bilirubina u krvotok i povišenja njegove koncentracije u krvi junica ogledne grupe. Do sličnih zaključaka došlo je više autora (Cuypers i sar., 1983; Van Steenbergen i sar., 1989; Bertoni i sar., 2008; Tennant i Center, 2008). U prilog ovom efektu indukcije hipotireoze govori trend kretanja prepartalne koncentracije bilirubina kod junica kontrolne grupe, koji se održavao na približno istom nivou sve do dana teljenja, prateći

koncentraciju tireoidnih hormona. Sličan trend su u svom istraživanju ustanovili i Prodanović i saradnici (2010).

Porast koncentracije bilirubina, koji je kod obje grupe junica ustanovljen u periodu od dana teljenja do 3. dana nakon teljenja, kada je dostignut gornji pik u toku ispitivanog perioda, može se dovesti u vezu sa povećanjem metaboličke aktivnosti hepatocita nakon teljenja. Na vezu metaboličke aktivnosti hepatocita i koncentracije bilirubina ukazuju rezultati do kojih su došli Loïselle i saradnici (2009) i Šamanc i saradnici (2011). Ovo povećanje je intenzivnije kod junica kontrolne grupe, vjerovatno zbog većeg opterećenja hepatocita masnim kiselinama mobilisanim iz tjelesnih depoa, što je u skladu sa rezultatima do kojih su došli drugi autori (Steen , 2001; Antončić-Svetina i sar., 2011).

Od 4. dana nakon teljenja prema kraju ispitivanog perioda došlo je do postepenog opadanja koncentracije bilirubina, koje je kod obje grupe junica bilo statistički značajno u odnosu na vrijednost ustanovljenu 3. dana nakon teljenja. Intenzivnijem opadanju koncentracije bilirubina kod junica ogledne grupe vjerovatno je doprinijela i pojačana metabolička aktivnost hepatocita pod uticajem povišene koncentracije tireoidnih hormona, posebno trijodtironina, zbog koje su potrošnja kiseonika i efikasnost glukuronidacije pristiglog bilirubina bili veći u odnosu na junice kontrolne grupe. Na vezu koncentracije tireoidnih hormona i metaboličke aktivnosti hepatocita ukazuju i rezultati drugih autora (Kapp i sar., 1979; Bertoni i sar., 2008; Prodanović i sar., 2010).

Iako tokom cijelog postpartalnog perioda nisu ustanovljene statistički značajne razlike u koncentraciji bilirubina između junica kontrolne i ogledne grupe, uočljivo je da su vrijednosti ustanovljene sve do 7. dana nakon teljenja više kod junica kontrolne grupe. Ovaj nalaz je vjerovatno posljedica većeg opterećenja jetre ovih životinja u odnosu na junice ogledne grupe zbog pojačanog priliva masnih kiselina iz tjelesnih depoa, na šta ukazuju niže koncentracije glukoze, insulina i IGF-I, kao i viša koncentracija BHBA, i u skladu je sa navodima drugih autora (Busato i sar., 2002; Bertoni i sar., 2008; Prodanović i sar., 2010; Kalaitzakis i sar., 2010).

U periodu od 15. dana nakon teljenja do kraja ispitivanog perioda, koncentracije bilirubina kod junica ogledne i kontrolne grupe su opadale, što je vjerovatno posljedica postepene stabilizacije energetskeg bilansa, na šta ukazuje i nalaz postepenog povišenja koncentracije glukoze i insulina, kao i opadanje koncentracije BHBA kod obje grupe

junica. Ovaj nalaz je u skladu sa navodima Šamanca i saradnika (2011) o vrijednostima koncentracije pojedinih biohemijskih parametara krvi nakon stabilizacije energetskog bilansa.

#### **6.6. Uticaj aplikacije PTU na stepen zamašćenja jetre i sadržaj glikogena u hepatocitima**

Koncentracija tireoidnih hormona tokom zasušenja i peripartalnog perioda može da bude jedan od indikatora postpartalnog zamašćenja jetre (Šamanc i sar., 2010). Kapp i saradnici (1979) su ukazali na povezanost snižene koncentracije tireoidnih hormona sa stepenom postpartalnog zamašćenja jetre, tumačeći njihovu negativnu korelaciju smanjenim kapacitetom mitohondrija za oksidaciju mobilisanih masnih kiselina zbog izostanka stimulacije tireoidnim hormonima.

Indukcija hipotireoze davanjem PTU u našem istraživanju nije dovela do prepartalnog zamašćenja jetre junica ogledne grupe, što je vjerovatno posljedica smanjenja bazalnog metabolizma i potreba u energiji, na šta ukazuje i velika količina deponovanog glikogena, vidljiva na histološkim preparatima tkiva jetre uzetim prepartalno. Dodatni faktor koji je spriječio zamašćenje jetre junica ogledne grupe tokom prepartalnog perioda su visoke koncentracije glukoze i insulina, koje su inhibirale lipomobilizaciju. Ovaj nalaz je u skladu sa navodima drugih autora (Liu i sar., 2010; Lomander i sar., 2012).

U našem istraživanju kod junica ogledne grupe ustanovljen je statistički značajno niži stepen postpartalnog zamašćenja jetre u odnosu na kontrolnu grupu, što je u skladu sa trendom kretanja postpartalne koncentracije tireoidnih hormona kod ogledne, odnosno kontrolne grupe junica. Ovaj nalaz je u skladu sa rezultatima do kojih su svom istraživanju došli Šamanc i saradnici (2010). Naime, kao rezultat prestanka tretmana sa PTU, kod junica ogledne grupe je u periodu do 3. dana nakon teljenja došlo je do porasta koncentracije  $T_4$  u odnosu na vrijednosti ustanovljene 1. dana nakon teljenja, dok je koncentracija  $T_3$  opala u odnosu na vrijednosti ustanovljene na dan teljenja, ali je ipak bila statistički značajno viša u odnosu na junice kontrolne grupe sve do 4. dana nakon teljenja. Istovremeno, kod junica kontrolne grupe je sve do 4., odnosno 5. dana nakon teljenja ustanovljena statistički značajno niža koncentracija oba tireoidna hormona u odnosu na vrijednosti ustanovljene na dan teljenja. Prilikom tumačenja

rezultata našeg istraživanja treba uzeti u obzir jaku kompenzatornu aktivnost tireoidee nastalu nakon prestanka inhibitornog djelovanja upotrebjene farmakološke doze PTU, koja je imala za posljedicu povišenje koncentracije tireoidnih hormona u sistemsnoj cirkulaciji i pojačanu aktivnost dejodinaza u tkivu jetre. Nalaz kompenzatorne hiperfunkcije tireoidee nakon prestanka tretmana sa PTU je u skladu sa rezultatima do kojih su došli Thrift i saradnici (1999a,b). Povišenje koncentracije tireoidnih hormona i pojačana dejodinacija  $T_4$  u tkivu jetre pozitivno su uticali na veličinu, broj i aktivnost mitohondrija, te intenziviranje beta oksidacije slobodnih masnih kiselina u hepatocitima ogleđne grupe junica. Ovaj nalaz je u skladu sa rezultatima drugih autora (Kapp i sar., 1979; Wrutniak-Cabello i sar., 2001; Weitzel i sar., 2003), a kao krajnji rezultat imalo brži metabolizam i smanjenu retenciju masnih kiselina u tkivu jetre, čime se može objasniti statistički značajno niži stepen postpartalnog zamašćenja jetre kod ogleđne grupe junica u odnosu na kontrolnu. Opisanom mehanizmu treba pridodati i činjenicu da je kompenzatorno povećanje aktivnosti tireoidee i periferne dejodinacije  $T_4$  u jetri ogleđne grupe junica nastalo u tranzicionom periodu, kada je koncentracija tireoidnih hormona u sistemsnoj cirkulaciji i aktivnost dejodinaza u jetri junica kontrolne grupe bila fiziološki niska. U prilog pojačanoj aktivnosti dejodinaza i stimulaciji lokalnog metabolizma u jetri junica ogleđne grupe pod uticajem kompenzatorne pojačane aktivnosti tireoidee ukazuju i vrijednosti odnosa ekspresija iRNK za DIO1 i DIO3 u tkivu jetre, koji je kod ogleđne grupe junica povećan približno šest puta u odnosu na prepartalne vrijednosti, a kod kontrolne grupe junica smanjen za približno 10%.

Istovremeno, više koncentracije insulina i glukoze u krvi junica ogleđne grupe, zajedno sa višim sadržajem glikogena u jetri, vjerovatno su inhibirale ili usporile nekontrolisanu postpartalnu lipolizu u masnom tkivu i lipomobilizaciju, čime je smanjeno opterećenje hepatocita. Ovaj nalaz je u skladu sa rezultatima do kojih je došao Haiyrl (2006). Očuvana sintetska funkcija hepatocita omogućila je im je sintezu apoproteina nosača za trigliceride, stvaranje VLDL i odnošenje masti iz jetre, čime je stepen zamašćenja dodatno smanjen. Do sličnih zaključaka došli su i drugi autori (Strang i sar., 1998; Bernabucci i sar., 2004; Van den Top i sar., 2005; Grummer, 2008; Oikawa i sar., 2010). Manji stepen zamašćenja omogućio je hepatocitima junica ogleđne grupe da nesmetano obavljaju svoje sintetske i detoksikacione funkcije u periodu kada su te funkcije kod junica kontrolne grupe bile ograničene zbog deponovanja masti u

jetri, na šta ukazuje i nalaz više postpartalne koncentracije IGF-I, kao indikator povoljnijeg bilansa energije.

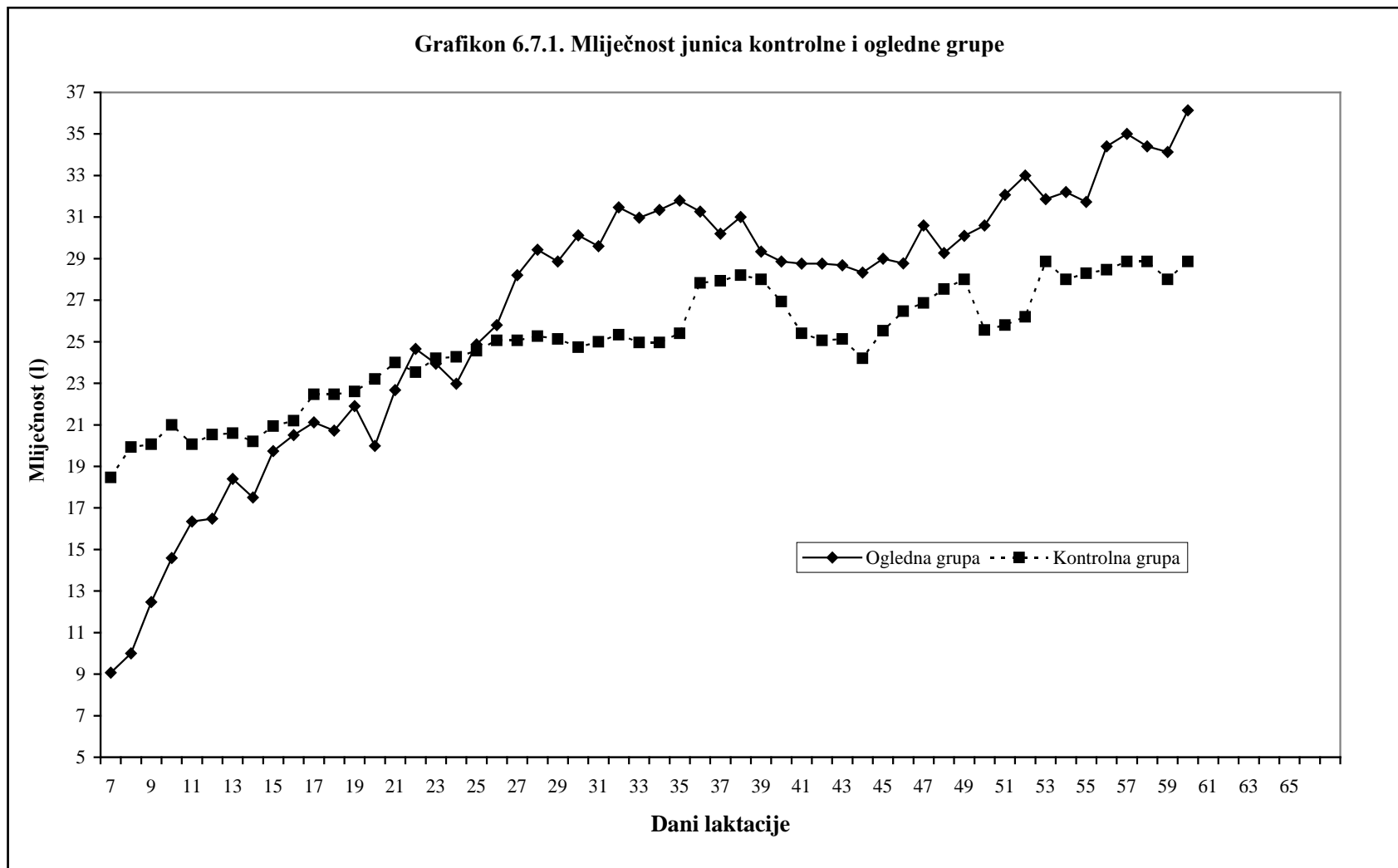
### **6.7. Uticaj aplikacije PTU na mliječnost i trajanje servis perioda**

Dnevna mliječnost junica ogledne i kontrolne grupe u periodu od 7. do 60. dana laktacije prikazana je na grafikonu 6.7.1. Detaljna statistička obrada tih podataka data je u poglavlju Rezultati, a na grafikonu je prikazan trend kretanja vrijednosti, u cilju lakšeg tumačenja dobijenih rezultata.

Povišena koncentracija tireoidnih hormona nakon prestanka davanja PTU preko stimulacije aktivnosti mitohondrija intenzivira procese razlaganja masnih kiselina u jetri, ali i drugim tkivima (Wrutniak-Cabello i sar., 2001). To potencira njihovo iskorištavanje za potrebe lokalnog energetskog metabolizma, zbog čega je preuzimanje masnih kiselina u svim perifernim tkivima kod ogledne grupe povećano, a koncentracija u krvi smanjena. U prilog pojačanom metabolizmu u tkivu jetre kod junica ogledne grupe govori i nalaz pojačane aktivnosti DIO1 u jetri. Istovremeno, povišena koncentracija tireoidnih hormona u sistemske cirkulaciji omogućava mliječnoj žlijezdi da ih preuzme i iskoristi za potrebe lokalnog metabolizma (Pezzi i sar., 2003).

Preuzimanje i iskorištavanje masnih kiselina iz krvi naročito je izraženo u mliječnoj žlijezdi, što se odražava i na proizvodnju mlijeka, koja kod junica ogledne grupe naglo raste od početka ispitivanog perioda i izjednačava se sa proizvodnjom mlijeka junica kontrolne grupe već trinaestog dana laktacije, da bi potom i dalje rasla i od 28. dana laktacije pa sve do kraja ispitivanog perioda bila viša za oko tri litra dnevno u odnosu na junice kontrolne grupe. U prilog ovoj tvrdnji su rezultati do kojih su došli Eslamizad i saradnici (2010).

Dodatni faktor koji povećava proizvodnju mlijeka kod ogledne grupe junica jeste i viša glikemija tokom ranog postpartalnog perioda, koja omogućava mliječnoj žlijezdi da iz sistemske cirkulacije preuzme veću količinu glukoze što pozitivno utiče na lokalni energetski metabolizam i količinu izlučenog mlijeka (Liu i sar., 2010). Na vezu potrošnju glukoze u tkivu mliječne žlijezde i količine proizvedenog mlijeka ukazuje niža glikemija koja je kod junica ogledne grupe ustanovljena 30. i 60. dana nakon teljenja. Ovaj nalaz je u skladu sa podacima koje navode Lomander i saradnici (2012).



**Grafikon 6.7.1.** Dnevna mliječnost junica kontrolne i ogledne grupe u periodu od 7. do 60. dana laktacije

Zulu i saradnici (2002a, b) navode da oslabljena postpartalna aktivnost jetre nepovoljno utiče na pojavu postpartalne reproduktivne aktivnosti mliječnih krava, jer izostaje sinteza IGF-I koji ima stimulatívni efekat na folikularnu dinamiku na jajnicima i ovulaciju. Očuvana sintetska funkcija jetre, ustanovljena u ovom istraživanju kod junica ogledne grupe tokom postpartalnog perioda pozitivno je uticala na koncentraciju IGF-I (Bobe i sar., 2004; Gross i sar., 2011), kao hormonalnog medijatora koji podstiče obnovu epitela materice i mliječne žlijezde i pokreće postpartalnu cikličnu aktivnost jajnika, zbog čega je kod njih involucija materice bila brža, a servis period kraći u odnosu na junice kontrolne grupe, iako nije ustanovljena statistički značajna razlika u trajanju servis perioda.

Povoljniji bilans energije, koji se manifestovao održavanjem više koncentracije glukoze i nižih koncentracija BHBA takođe je pozitivno uticao na skraćenje servis perioda kod ogledne grupe junica, što je u skladu sa zaključcima do kojih su došli Reist i saradnici (2000) i Koller i saradnici (2003). Ovi autori su ustanovili da krave sa višim koncentracijama BHBA tokom prvih šest nedelja nakon teljenja imaju duži servis period i odloženu pojavu postpartalne reproduktivne aktivnosti u odnosu na krave kod kojih je koncentracija BHBA niža.

Posmatrano na nivou farme, statistički značajno skraćenje servis perioda ostvareno kod junica ogledne grupe imalo je pozitivan efekat na njihove reproduktivne i proizvodne performanse, zbog čega rezultati ovog istraživanja imaju i odgovarajući praktični značaj.



## 7. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata i njihovog tumačenja izvedeni su sljedeći zaključci:

- Peroralna aplikacija PTU u dozi od 4 mg/kg tjelesne mase tokom posljednjih dvadeset dana graviditeta indukovala je hipotireozu, koja se manifestovala statistički značajnim smanjenjem koncentracije  $T_4$  i  $T_3$  u krvi junica ogleđne grupe.
- Nakon prestanka tretmana, odmah nakon teljenja, koncentracija  $T_3$  se značajno povećala, dok se koncentracija  $T_4$  povećala dva dana kasnije. To ukazuje da se po prestanku davanja PTU prvo uspostavlja aktivnost dejodinaza u perifernim tkivima, a tek potom sinteza i sekrecija hormona na nivou tireoidee.
- Kompenzatorna hipertireoza nastala u ranom postpartalnom periodu kod ogleđne grupe junica manifestovala se značajno višim koncentracijama hormona tireoidee u poređenju sa vrijednostima dobijenim u istom periodu kod kontrolne grupe junica koje nisu bile pod tretmanom.
- U toku tretmana sa PTU vrijednosti insulinemije i glikemije su bile statistički značajno više kod junica ogleđne grupe, što ukazuje na određen stepen insulinske rezistencije. U prilog tome govore i vrijednosti HOMA indeksa, koje su kod njih bile značajno veće u odnosu na junice kontrolne grupe, počevši od sedmog dana nakon prve aplikacije PTU, pa sve do kraja tretmana, odnosno do teljenja.
- Visoka insulinemija, nastala kao posljedica indukovane hipotireoze, inhibitorno je uticala na proces lipomobilizacije i intenzitet ketogeneze. Zbog toga je u toku trajanja tretmana koncentracija BHBA u krvi bila značajno niža kod ogleđnih u odnosu na junice kontrolne grupe.
- Značajno niža koncentracija BHBA u krvi junica ogleđne grupe i u postpartalnom periodu, uz istovremeni nalaz povišene insulinemije i glikemije, ukazuje da je kod njih kao rezultat kompenzatorne hipertireoze u tom periodu umjesto negativnog uspostavljen pozitivan bilans energije.
- Koncentracija IGF-I je tokom cijelog ispitivanog perioda bila značajno viša kod junica ogleđne grupe, što ukazuje da je njihov energetska status bio povoljniji, kako tokom perioda indukovane hipotireoze (prepartalno), tako i tokom perioda kompenzatorne pojačane aktivnosti tireoidee (postpartalno).

- Značajno manji stepen zamašćenja jetre ustanovljen kod junica ogledne grupe je rezultat smanjenog priliva masnih kiselina iz tjelesnih depoa i efikasnijeg iskorištavanja mobilisanih masti kao izvora energije u uslovima kompenzatorne hipertireoze u ranom postpartalnom periodu.
- Kao posljedica povoljnijeg energetskeg statusa, kako tokom prepartalnog, tako i tokom postpartalnog perioda, junice ogledne grupe imale su značajno višu mliječnost i kraći servis period. Po svemu sudeći, pojačana aktivnost tireoidee u ranom postpartalnom periodu može doprinijeti očuvanju morfološkog i funkcionalnog integriteta jetre, a samim tim i bržem uspostavljanju energetske ravnoteže na početku laktacije, što je veoma značajno kod krava sa genetskom predispozicijom za visoku proizvodnju mlijeka.

## 8. LITERATURA

1. \*\*\* Department of Agriculture (2000): Thyrostatic Drugs, Washington DC, Food Safety and Inspection Service. (<http://www.fsis.usda.gov>).
2. \*\*\* European Commission (1981): Council Directive of 31 July 1981 concerning the prohibition of certain substances having a hormonal action and of any substances having a thyrostatic action, Off. J. Eur. Comm., L222, 32-33.
3. Aceves, C., Valverde C. (1989): Type I 5'-monodeiodinase activity in the lactating mammary gland. *Endocrinol.* 124:2818–2820.
4. Ahima, R.S., Flier, J.S. (2000): Leptin. *Annual Review of Physiology* 62, 413-437.
5. Ahima, R.S., Kelly, J., Elmquist, J.K., Flier, J.S. (1999): Distinct physiologic and neuronal responses to decreased leptin and mild hyperleptinemia. *Endocrinology*, 140, 4923-4931.
6. Anderson, R.R. (1971): Secretion rates of thyroxine and triiodothyronine in dairy cattle, *J. Dairy Sci.*, 54, 1195-1199.
7. Andrews, A.H., Laven, R., Maisey, I. (1991): Treatment and control of an outbreak of fat cow syndrome in a large dairy herd. *Vet. Rec.*, 129, 216.
8. Antončić-Svetina, M., Turk, R., Svetina, A., Gereš, D., Rekić, B., Juretić, D. (2011): Lipid status, paraoxonase-1 activity and metabolic parameters in serum of heifers and lactating cows related to oxidative stress. *Res. Vet. Sci.* 90 (2):298-300.
9. Arauda, A., Hervas, F., Morreale de Escobar, G., Escobar del Rey, F. (1976): Effects of small doses of L-thyroxine and triiodo-L-thyronine on pituitary LH content of thyroidectomised rats. *Acta Endocrinol.*, 83, 726-736.
10. Aschenbach, J.R., Kristensen, N.B., Donkin, S.S., Hammon, H.M., Penner, G.B. (2010): Gluconeogenesis in dairy cows: the secret of making sweet milk from sour dough. *IUBMB Life*, 62(12):869-77.
11. Awadeh, F.T., Kincaid, R.L., Johnson, K.A. (1998): Effect of level and source of dietary selenium on concentrations of thyroid hormones and immunoglobulins in beef cows and calves. *J. Anim. Sci.*, 76,1204-1215.
12. Baird, G.D. (1982): Primary ketosis in the high-producing dairy cow: clinical and subclinical disorders, treatment, prevention, and outlook. *J. Dairy Sci.* 65, 1-10.

13. Ballard, F.J., Baxter, R., Binoux, M., Clemmons, D., Drop, S., Hall, K., Hintz, R., Rechler, M., Rutanen, E., Schwander, J. (1989): On the nomenclature of the IGF binding proteins. *Acta Endocrinol.*, 121, 751-752.
14. Baloš, D., Pantić, V. (1980): Thyroid glands in immature and mature female rats treated with estradiol. *Acta veterinaria*, 30, 25.
15. Barberan, M., Valderrábano, J. (1987): Pathological features in thymus and thyroids of lambs fed on turnips. *Veterinary Record*, 120, 367-368.
16. Bartlett, J.P. (1972). Calcium homeostasis in the normal and thyroidectomised bovine. *Hormone and Metabolism Research*, 4, 300-303.
17. Basset, J.M. (1971): The effects of glucagon on plasma concentrations of insulin, growth hormone, glucose, and free fatty acids in sheep: comparison with the effects of catecholamines. *Aust. J. Biol. Sci.* 24, 311-320.
18. Bauman, D.E., Currie, W.B. (1980): Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeoresis. *J. Dairy Sci.*, 63, 1514-1529.
19. Bauman, D.E., Elliot, J. M. (1983): Control of nutrient partitioning in lactating ruminants. U: *Biochemistry of Lactation* (Ed. T.B. Mepham), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 437.
20. Bauman, D.E., Vernon, R.G. (1993): Effects of exogenous bovine somatotropin on lactation. *Ann. Rev. Nutr.*, 13, 437-461.
21. Beale, E., Andreone, T., Koch, S., Granner, D. (1984): Insulin and glucagon regulate cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) mRNA in rat liver. *Diabetes* 33, 328-332.
22. Beam, S.W., Butler, W.R. (1998): Energy balance, metabolic hormones, and early postpartum follicular development in dairy cows fed prilled lipid. *J. Dairy Sci.*, 81, 121-131.
23. Beam, S.W., Butler, W.R. (1999): Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)* 54, 411-424.
24. Beaufoy, V., Ketelslegers, J.M., Moreau, B., Thissen, J.P. (1999): Dexametasone inhibits both growth hormone (GH)-induction of insulin-like growth factor – I

- (IGF-I) mRNA and GH receptor (GHR) mRNA levels in rat primary cultured hepatocytes. *Growth Horm. IGF Res.*, 9, 203-211.
25. Beckett, G.J., Arthur, J.R. (1994): The iodothyronine deiodinases and 5'-deiodination. U: *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism – Hormones, Enzymes and Receptors* (Eds. M.C. Sheppard, P.M. Stewart), London, Bailliere Tindall. 285-304.
  26. Beckett, G.J., Beech, S., Nicol, F., Walker, S.W., Arthur, J.R. (1993): Species differences in thyroidal iodothyronine deiodinase expression and the effect of selenium deficiency on its activity. *Journal of Trace Elements and Electrolytes In Health and Disease* 7, 123-124.
  27. Beitz, D.C. (2004): *Carbohydrate metabolism*, U: *Duke's Physiology of Domestic Animals*, 12th edition (Ed., W.O. Reece), Cornell University Press, Ithaca, London, 501-534.
  28. Bell, A.W. (1995): Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation, *J. Anim. Sci.*, 73, 2804-2819.
  29. Bell, A.W., Bauman, D.E. (1997): Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.*, 2 (3):265-278.
  30. Bell, A.W., Burhans, W.S., Overton, T.R. (2000): Protein nutrition in late pregnancy, maternal protein reserves and lactation performance in dairy cows. *Proc Nutr Soc.*, 59 (1):119-126.
  31. Bernabucci U., Ronchi B., Basiricò L., Pirazzi D., Rueca F., Lacetera N., Nardone A.. (2004): Abundance of mRNA of apolipoprotein b100, apolipoprotein e, and microsomal triglyceride transfer protein in liver from periparturient dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 87(9):2881-2888.
  32. Bernabucci, U., Ronchi, B., Lacetera, N., Nardone, A. (2005): Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 88(6):2017-2026.
  33. Bernal, A., (1996): Effects of induced hypothyroidism on ovarian response to superovulation in Brahman (*Bos indicus*) cows, M.S. thesis, Texas A&M University, College Station.

34. Bernal, A., DeMoraes, G.V., Thrift, T.A., Willard C.C., Randel R.D. (1999): Effects of induced hypothyroidism on ovarian response to superovulation in Brahman (*Bos indicus*) cows, *J. Anim. Sci.*, 77:2749-2756.
35. Bernal, J., De Groot, L.J. (1980): Mode of action of thyroid hormones, U:The thyroid gland (Ed. M. DeVisscher), Raven Press, New York, 123-143.
36. Bertics, S., Grummer, R., Cadorniga-Valino, C., Stoddard, E. (1992): Effect of prepartum dry matter intake on liver triglyceride concentration and early lactation. *J. Dairy Sci.*, 75, 1914-1922.
37. Bertoni, G., Trevisi, E., Han, X., Bionaz, M. (2008): Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 91(9):3300-3310.
38. Bhattacharjee, M., Vonderhaar, B.K. (1984): Thyroid hormones enhance the synthesis and secretion of alpha lactalbumin by mouse mammary tissue in vitro. *Endocrinology*, 115:1070-1077.
39. Bianco, A.C., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M.J., Larsen, P.R. (2002): Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine Reviews* 23, 38-89.
40. Bishop, D.K., Wetteman, R.P., Spicer, L.J., (1994): Body energy reserves influence the onset of luteal activity after early weaning of beef cows. *J. Anim. Sci.*, 72, 2703-2708.
41. Bitman, J., Kahl, S., Wood, D.L., Lefcourt, A.M. (1994): Circadian and ultradian rhythms of plasma thyroid hormone concentrations in lactating dairy cows. *Am. J. Physiol.*, 266, 1797-1803.
42. Blatt, L.M., Kim, K.H. (1971): Regulation of hepatic glycogen synthetase. Stimulation of glycogen synthetase in an in vitro liver system by insulin bound to sepharose. *The Journal of Biological Chemistry*, 246, 4895-4898.
43. Block, S.S., Butler, W.R., Ehrhardt, R.A., Bell, A.W., Van Amburgh, M.E., Boisclair, Y.R. (2001): Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. *J. Endocrinol.*, 171, 339-348.
44. Blum, J.W., Bruckmaier, R.M., Vacher, P.Y., Münger, A., Jans, F. (2000): Twenty-four-hour patterns of hormones and metabolites in week 9 and 19 of

- lactation in high-yielding dairy cows fed triglycerides and free fatty acids. *J. Vet. Med. A*, 47, 43-60.
45. Blum, J.W., Kunz, P., Leunberger, H., Gautschi, K., Keller, N. (1983): Thyroid hormones, blood plasma metabolites and haematological parameters in relationship to milk yield in Dairy cows. *Anim. Prod.*, 36, 93-104.
  46. Bobe, G., Ametaj, B.N., Young, J.W., Beitz, D.C. (2003): Effects of exogenous glucagon on lipids in lipoproteins and liver of lactating dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 86(9):2895-2903.
  47. Bobe, G., Young, J.W., Beitz, D.C. (2004): Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 87(10):3105-3124.
  48. Boden, G., Chen, X., Kolaczynski, J.W., Polansky, M. (1997): Effects of prolonged hyperinsulinemia on serum leptin in normal human subjects. *Journal of Clinical Investigation*, 100, 1107-1113.
  49. Boisclair, Y.R., Bell, A.W., Dunshea, F.R., Harkins, M., Bauman, D.E. (1993): Evaluation of the arteriovenous difference technique to simultaneously estimate protein synthesis and degradation in the hindlimb of fed and chronically underfed steers. *J. Nutr.*, 123, 1076-1088.
  50. Boisclair, Y.R., Dunshea, F.R., Bell, A.W., Bauman, D.E., Harkins, M. (1989): Effect of bovine somatotropin on glucose metabolism in steers. *FASEB J.*, 3, A983 (Abstr.)
  51. Bonczek, R.R., Young, C.W., Wheaton, J.E., Miller, K.P. (1988): Responses of somatotropin, insulin, prolactin, and thyroxine to selection for milk yield in holsteins. *J. Dairy Sci.* 71, 2470-2479.
  52. Breier, B.H., Bass, J.J., Butler, J.H., Gluckman, P.D. (1986): The somatotropic axis in young steers: influence of nutritional status on pulsatile release of growth hormone and circulating concentrations of insulin-like growth factor-1. *J. Endocrinol.*, 111, 209-215.
  53. Breukink, H.J., Wensing, T.H. (1998): Patophysiology of the liver in high yielding dairy cows and its consequences for health and production. *The Bovine Practitioner*, 32, 74-78.

54. Browning, R., Gissendanner, S.J., Wakefield, T. (2000): Ergotamine alters plasma concentration of glucagon, insulin, cortisol, and triiodothyronine in cows. *J. Anim. Sci.*, 78, 690-698.
55. Browning, R., Leite-Browning, M.L., Smith, H.M., Wakefield, T. (1998): Effect of ergotamine and ergonovine on plasma concentration of thyroid hormones and cortisol in cattle, *J. Anim. Sci.*, 76, 1644-1650.
56. Brugere-Picoux, J., Brugere, H. (1987): Particularities de la biochemie clinique des ruminants. *Rec. Vet. Med*, 163(11): 1043-1053.
57. Bugarski, D., (2002): Koncentracije insulina, insulinu sličnog faktora rasta-1 i parametara pokazatelja funkcionalnog stanja jetre u krvi zdravih i ketoznih krava. Magistarska teza, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine.
58. Buonomo, F.C., Baile, C.A. (1991): Influence of nutritional deprivation on insulin-like growth factor I, somatotropin, and metabolic hormones in swine. *J. Anim. Sci.*, 69, 755-760.
59. Burger, A.G. (1991): Effects of pharmacological agents on thyroid hormone metabolism. U: *The Thyroid*, 6<sup>th</sup> edition, (Eds. L.E. Braverman, R.D. Utiger), J.B. Lippincott, New York, 335-346.
60. Burroughs, W., Raun, A., Trenkle, A., Raun, N. (1960): Further observations upon effects of methimazole upon feedlot performance and carcass characteristics of fattening beef cattle. *J. Anim. Sci.* 19:465-469.
61. Busato, A., Faissle, D., Küpfer, U., Blum, J.W. (2002): Body condition scores in dairy cows: associations with metabolic and endocrine changes in healthy dairy cows. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.* 49(9):455-460.
62. Butler, W.R. (2003): Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livestock Production Science*, 83, 211-218.
63. Canfield, R.W., Butler, W.R. (1990): Energy balance and pulsatile LH secretion in early postpartum dairy cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 7, 323-330.
64. Cant, J.P., Trout, D.R., Qiao, F., Purdie, N.G. (2002): Milk synthetic response of the bovine mammary gland to an increase in the local concentration of arterial glucose. *J. Dairy Sci.*, 85(3):494-503.



65. Capen, C.C., Martin, S.L. (2003): The Thyroid Gland. u: McDonald's Veterinary Endocrinology and Reproduction (Eds. M.H. Pineda, M., Dooley), Iowa State Press, 35-70.
66. Capuco, A.V., Connor, E.E., Wood, D.L. (2008): Regulation of mammary gland sensitivity to thyroid hormones during the transition from pregnancy to lactation. *Experimental Biology and Medicine*, 233:1309-1314.
67. Capuco, A.V., Kahl, S., Jack, L.J.W., Bishop, J.O., Wallace, H. (1999): Prolactin and growth hormone stimulation of lactation in mice requires thyroid hormones. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 221:345-351.
68. Capuco, A.V., Keys, J.E., Smith, J.J. (1989): Somatotrophin increases thyroxine-5 monodeiodinase activity in lactating mammary tissue of the cow. *J. Endocrinol.*, 121, 2, 205-211.
69. Capuco, A.V., Wood, D.L., Elsasser, T.H., Kahl, S., Erdman, R.A., Van Tassell, C.P., Lefcourt, A., Piperova, L.S. (2001): Effect of Somatotropin on Thyroid Hormones and Cytokines in Lactating Dairy Cows During Ad Libitum and Restricted Feed Intake. *J. Dairy Sci.*, 84: 2430-2439.
70. Cassar-Malek, I., Kahl, S., Jurie, C., Picard, C. (2001): Influence of feeding level during postweaning growth on circulating concentrations of thyroid hormones and extrathyroidal 5'-deiodination in steers. *J. Anim. Sci.* 79: 2679-2687.
71. Cebra, C.K., Garry, F.B., Getzy, D.M., Fettman, M.J. (1997): Hepatic lipidosis in anorectic, lactating holstein cattle: a retrospective study of serum biochemical abnormalities. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 11(4): 231-237.
72. Chandra, A.K., Mukherjee, A.K. (1985): Glucose metabolism in insulin administered euthyroid, hypothyroid and hyperthyroid rats. *Endocrinol. Jpn.*, 32(4):447-453.
73. Chandrasekhar, Y., D'Occhio, M.J., Holland, M.K., Setchell, B.P. (1985b): Activity of the hypothalamo-pituitary axis and testicular development in the prepubertal ram lambs with induced hypothyroidism or hyperthyroidism. *Endocrinology*, 117, 1645-1651.
74. Chandrasekhar, Y., Holland, M.K., D'Occhio, M.J., Setchell, B.P. (1985a): Spermatogenesis, seminal characteristics and reproductive hormone levels in

- mature rams with induced hypothyroidism and hyperthyroidism. *Journal of Endocrinology*, 105, 39-46.
75. Chapinal, N., Carson, M.E., LeBlanc, S.J., Leslie, K.E., Godden, S., Capel, M., Santos, J.E., Overton, M.W., Duffield, T.F. (2012): The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance. *J. Dairy Sci.*, 95(3):1301-1309.
  76. Chassande, O. (2003): Do unliganded thyroid hormone receptors have physiological functions? *Journal of Molecular Endocrinology*, 31, 9-20.
  77. Chillard, Y., Bonnet, M., Delavaud, C., Faulconnier, Y., Leroux, C., Dijane, J., Bocquier, F. (2001): Leptin in ruminants. gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Dom. Animal Endocrinol*, 21, 271-295.
  78. Chillard Y., Delavaud C., Bonnet M. (2005): Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domest Anim Endocrinol.*, 29(1):3-22.
  79. Chillard, Y. (1990): Somatotropine et lactation, *Recuell de Medicine Veterinair*, 166, 513.
  80. Chopra, I.J., Chu Teco, G.N., Eisenberg, J.B., Wiersinga, W.M., Solomon, D.H. (1982): Structure-activity relationships of inhibition of hepatic monodeiodination of thyroxine to 3,5,3'-triiodothyronine by thiouracil and related compounds. *Endocrinology*, 110:163-168.
  81. Christofides, N.D., Wilkinson, E., Stoddart, M., Ray, D.C., Beckett, G.J. (1999): Serum thyroxine binding capacity-dependent bias in an automated free thyroxine assay. *Journal of Immunoassay*, 20, 201-221.
  82. Ćirić, O. (1981): Uticaj ovarijumskih hormona na funkciju štitaste žlezde pacova, *Med. istr.*, Izvod iz doktorske disertacije.
  83. Clemmons, D.R. (1997): Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 8, 45-62.
  84. Clemmons, D.R., Thissen, J.P., Maes, M., Ketelslegers, J.M., Underwood, L.E. (1989): Insulin-like growth factor – I (IGF-I) infusion into hypophysectomised or protein-deprived rats induces specific IGF-binding proteins in serum. *Endocrinology*, 125, 2967-2972.

85. Cohick, W.S., Slepetic, R., Harkins, M., Bauman, D.E. (1978): Effects of exogenous bovine somatotropin (bST) on net flux rates of glucose and insulin across splanchnic tissue of cows. *J. Dairy Sci.* 61, 1709-1714.
86. Cole, N.A., Gallavan, R.H., Rodriguez, S.L., Purdy, C.W. (1994): Influence of triiodothyronine injections on calf immune response to an infectious bovine rinotracheitis virus challenge and nitrogen balance of lambs. *J. Anim. Sci.*, 72, 1263-1273.
87. Connor, E.E., Laiakis, E.C., Fernandes, V.M., Williams J.L., Capuco, A.V. (2005): Molecular cloning, expression and radiation hybrid mapping of the bovine deiodinase type II (DIO2) and deiodinase type III (DIO3) genes. *Anim. Genet.* 36:240-243.
88. Considine, R.V. (2009): *The Thyroid Gland u: Medical Physiology – Principles for Clinical Medicine* (Eds. R.A. Rhoades, D.R. Bell), 3<sup>rd</sup> Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 612-623.
89. Corah, L.R., Ives, S. (1991): The effects of essential trace minerals on reproduction in beef cattle, *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 7, 41-57.
90. Coulon, J.B., Remond, B., Doreau, M., Journet, M. (1985): Various blood parameters of energy metabolism in dairy cows at the start of lactation. *Ann. Rech. Vet.* 16(3):185-193.
91. Ćupić, V., Muminović, M., Kobal, S., Velez, R. (2007a): „Farmakologija vitamina, minerala i mikroelemenata“ u: *Farmakologija za studente Fakulteta veterinarske medicine*, Beograd, Sarajevo, Ljubljana, Skoplje, 425.
92. Ćupić, V., Muminović, M., Kobal, S., Velez, R. (2007b): „Farmakologija hormona – tireoidni hormoni“ u: *Farmakologija za studente Fakulteta veterinarske medicine*, Beograd, Sarajevo, Ljubljana, Skoplje, 435-438
93. Cuypers, H.T., Ter Haar, E.M., Jansen, P.L. (1983): Microsomal conjugation and oxidation of bilirubin. *Biochim Biophys Acta.* 29;758(2):135-143.
94. Daughaday, W.H., Hall, K., Salmon, W.D., Van Den Brande, J.L., Van Wyk, J.J. (1987): On the nomenclature of the somatomedins and insulin-like growth factors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 65, 1075-1076.

95. Davis, S.R., Collier, R.J., McNamara, J.P., Head, H.H. (1983): Effects of thyroxine and growth hormone treatment of dairy cows on milk yield, cardiac output and mammary blood flow. *Proc. Aust. Soc. Endocrinol.* 26 (Suppl. 1), 31 (Abstr.).
96. Davis, S.R., Gluckman, P.D., Hart, I.C., Henderson, H.V. (1987): Effects of injecting growth hormone or thyroxine on milk production and blood plasma concentrations of insulin-like growth factors I and II in dairy cows, *J. Endocrinol.*, 114, 17-24.
97. De Sandro, V., Chevrier, M., Boddaert, A., Malcion, C., Cordier, A., Richert, L. (1991): Comparison of the effects of propylthiouracil, amiodarone, diphenylhydantoin, phenobarbital, and 3-methylcholantrene on hepatic and renal T<sub>4</sub> metabolism and thyroid gland function. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 111, 263-278.
98. De Vries, M.J., Van der Beek, S., Kaal-Lansbergen, L.M.T.E., Ouweltjes, W., Wilmink, J.B.M. (1999): Modeling of energy balance in early lactation and the effect of energy deficits in early lactation on first detected estrus postpartum in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82, 1927-1934.
99. Delamaire, E, Guinard-Flament, J. (2006): Increasing milking intervals decreases the mammary blood flow and mammary uptake of nutrients in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 89(9):3439-3446.
100. DeMoraes, G.V., Vera-Avila, H.R., Lewis, A.W., Koch, J.W., Neuendorff, D.A., Hallfor, D.M., Reeves, J.J., Randel, R.D. (1998): Influence of hypo- and hyperthyroidism on ovarian function in Brahman cows. *J. Anim. Sci.* 76:871-879.
101. D'Ercole, A.J., Stiles, A.D., Underwood, L.E. (1984): Tissue concentrations of somatomedin-C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of actions. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 81, 935-939.
102. Dickson, W.M. (1990): Endocrine glands. U: *Dukes Physiology of Domestic Animals*, (Ed. M.J. Swenson):, Tenth edition, Cornell University Press, Ithaca, 761-797.
103. Dirksen, G.H., Liebich, H.G., Mayer, E. (1999): Adaptive changes of the ruminal mucosa and their functional and clinical significance. *Bov. Pract.*, 20, 116-120.

104. Do Amaral, B.C., Connor, E.E., Tao, S., Hayen, J., Bubolz, J., Dahl, G.E. (2010): Heat stress abatement during the dry period influences prolactin signaling in lymphocytes. *Domestic Animal Endocrinology* 38:38–45.
105. Doepel, L., Lapierre, H., Kennelly, J. J. (2002): Peripartum performance and metabolism of dairy cows in response to prepartum energy and protein intake. *J. Dairy Sci.* 85:2315–2334.
106. Đoković, R. (1998): Koncentracija lipida, trijodtironina, tiroksina, insulina i kortizola u krvi i histološke promene u jetri kod krava u peripartalnom periodu. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine
107. Đoković, R., Šamanc, H, Jovanović, M., Nikolić, Z. (2007): Blood Concentrations of Thyroid Hormones and Lipids and Content of Lipids in the Liver in Dairy Cows in Transitional Period. *Acta Veterinaria Brno*, 76, 525-532.
108. Donaghy, A.J., Baxter, R.C. (1996): Insulin-like growth factor bioactivity and its modification in growth hormone resistant states. *Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism*, 10, 421-426.
109. Drackley, J.K. (1999): ADSA Foundation Scholar Award.: Biology of dairy cows during the transition period; the final frontier. *J. Dairy Sci.*, 32, 11, 2259-2273.
110. Đurđević, Đ, Šamanc, H., Stojić, V. (1985): The effect of ACTH on the concentration of glucose, thyroxine, triiodthronine and cortisol in the blood of ketotic kows. *Acta veterinaria*, 35, 1-2, 1-8.
111. Đurđević, Đ., Stojić, M., Jovanović, M., Radaković, N. (1980): Concentration of thyroxine, triiodthronine and cortisol in the blood of ketotic kows. *Acta veterinaria*, 1-2, 7.
112. Ekman, L. (1965): Thyroidectomy of the goat. *Acta Physiologica Scandinavia*, 65, 331-336.
113. Elsasser, T.H., Rumsey, T.S., Hammond, A.C., Fayer, R. (1988): Influence of parasitism on plasma concentrations of growth hormone, somatomedin – C and somatomedin-binding proteins in calves. *J. Endocrinol.* 116, 191-200
114. Elsasser, T.H., Rumsey, T.S., Kahl, S. (1993): Relationships between the thyroid and somatotropic axes in steers. II: Effects of thyroid status on plasma concentrations of insulin-like growth factor I (IGF-I) and the IGF-I response to growth hormone. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 10(2):71-85.

115. Elsasser, T.H., Rumsey, T.S., Norton, S.A. (1992): Relationships between thyroid and somatotropic axes in steers, I: Effects of propylthiouracil-induced hypothyroidism on growth hormone, thyroid stimulating hormone and insulin-like growth factor-1, *Domest. Anim. Endocrinol.*, 9:261-271
116. Eppinga, M., Suriyasathaporn, W., Kulcsar, M., Huszenica, Gy., Wensing, T., Dieleman, S.J. (1999): Thyroxine and triiodothyronine in association with milk yield,  $\beta$ OH-butyrate, and non-esterified fatty acid during peak of lactation. Abstract, *J.Dairy Sci.* 82 (Suppl.), 50.
117. Erhardt, R.A., Slepatis, R.M., VanAmburg, V.E., Siegal-Willot, J., Bell, A.V., Boisclair, Y.R. (2000): Development of a specific RIA to measure physiological changes in circulating leptin in cattle and sheep. *Journal of Endocrinol.*, 166, 519-528,
118. Escobar del Rey, F., Morreale del Escobar, G. (1961): The effect of propylthiouracil, methylthiouracil and thiouracil on the peripheral metabolism of l-thyroxine and thyroidectomized l-thyroxine maintained rats. *Endocrinol.*, 69:456-465.
119. Escobar del Rey, F., Morreale del Escobar, G., Garcia Garcia, M.D., Mouriz Garcia, J. (1961): Increase in the rates of release of thyroidal iodine-131 and of circulating thyrotrophic activity at early stages of propylthiouracil treatment in the rat. *Nature* 191:1171-1173.
120. Escobar del Rey, F., Morreale del Escobar, G., Garcia Garcia, M.D., Mouriz Garcia, J. (1962): Increased secretion of thyrotrophic hormone in rats with depressed peripheral deiodination of thyroid hormone and a normal or high plasma PBI. *Endocrinol.*, 71:859-869.
121. Eskin, B.A., Bogdanove, E.M. (1956): The influence of estrogen upon goiter induction in adult and immature rats. *Endocrinol.*, 59, 688-694.
122. Eslamizad, M., Dehghan-Banadaky, M., Rezayazdi, K., Moradi-Shahrbabak, M. (2010): Effects of 6 times daily milking during early versus full lactation of Holstein cows on milk production and blood metabolites. *J. Dairy Sci.* 93(9):4054-4061.

123. Faulkner, A., Pollock, H. T. (1990): Metabolic responses to euglycaemic hyperinsulinaemia in lactating and non-lactating sheep in vivo. *J. Endocrinol*, 124, 59-66.
124. Ferguson, K.A., Wallace, A.L.C., Lindner, H.R. (1965): Hormonal regulation of wool growth. U: *Biology of skin and hair growth* (Eds. A.G. Lyne, B.F. Short), Angus & Robertson, Sydney, 655-678.
125. Ferguson, K.A., Schinkel, P.G., Carter, H.B., Clarke, W.H. (1956): The influence of the thyroid on wool follicle development in the lamb. *Australian Journal of Biological Science*, 9, 575-585.
126. Filipović, N., Stojević, Z. (2011): Metabolički učinci somatotropne osi. *Veterinarska stanica* 42, 5, 453-464.
127. Filipović, N., Stojević, Z., Bačar-Huskić, L. (2007): Energetski metabolizam u krava tijekom razdoblja rane laktacije. *Praxis veterinaria*, 55, (1-2), 91-100.
128. Flier, J.F., Harris, M., Hollenberg, A.N. (2000): Leptin, nutrition and the thyroid: the why, the wherefore, and the wiring. *J. Clin. Invest.*, 105, 859-861.
129. Follet, B.K., Potts, C. (1990): Hypothyroidism affects reproductive refractoriness and the seasonal oestrus period in Welsh Mountain ewes. *Journal of Endocrinology*, 127, 103-109.
130. Forbes J.M. (1986): The effects of sex hormones, pregnancy, and lactation on digestion, metabolism and voluntary food intake. U: *Control of Digestion and Metabolism in Ruminants* (Eds. L.P. Milligan, W.L. Grovum, A. Dobson), Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 420.
131. Ford, E. J.H. (1959): Metabolic changes in the cattle near the time of parturition. I. Hepatic fat and alkaline phosphate activity of liver homogenates. *J. Comparat. Path.* 69, 20-28.
132. Forenbacher, S. (1993): Klinička patologija probave i mijene tvari. Svezak II. *Jetra, Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti i Školska knjiga, Zagreb.*
133. Foster, D.J., Thoday, K.L., Beckett, G.J. (2000): Thyroid hormone deiodination in domestic cat. *Journal of Molecular Endocrinology* 24, 119-126.
134. Friedman, J.M., Hallas, J.L. (1998): Leptin and regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395, 763-770.

135. Fukuda, H., Ohshima, K., Mori, M., Kobayashi, I., Greer, M.A. (1980): Sequential changes in the pituitary-thyroid axis during pregnancy and lactation in the rat, *Endocrinol.*, 107:1711-1716.
136. Furll, M., Schafer, M. (1993): Niacinwirkung bei milchkuhenwahrend futterrntzug. *Mh. Vet. Med.* 48, 13-15.
137. Gaal, T. (1993): Sindrom masne jetre u mlečnih krava. *Veterinarski glasnik*, 47,4-5, 311-317.
138. Galaton, V.A. (1971): Thyroxine metabolism and function in rats following administration of estrogen. *Endocrinol.*, 88, 976.
139. Gallaher, B.W., Breier, B.H., Oliver, M.H., Harding, J.E., Gluckman, P.D. (1992): Ontogenic differences in the nutritional regulation of circulating IGF binding proteins in sheep plasma. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, 126, 49-54.
140. Gardner, R.M., Kiruland, J.L., Ireland, J.S., Stancel, M.G. (1978): Regulating of the uterine response to estrogen by thyroid hormone. *Endocrinol.*, 103, 1164.
141. Garnsworthy, P.C., Jones, G.P. (1987): The influence of body condition at calving and dietary protein supply on voluntary food intake and performance in dairy cows. *Anim. Prod.*, 44, 347-353.
142. Garnsworthy, P.C., Topps, J.H. (1982): The effect of body condition of dairy cows at calving on their food intake and performance when given complete diets. *Anim. Prod.*, 35, 113-119.
143. Gennano-Soffieti, M., Nebbia, C., Biolatti, B., Re, G., Castagnaro, M., Cottino, F., Guarda, F. (1988): Toxicology of fungicides: effects of 270 days administration of zinc-ethylene-bis-dithiocarbamate in Friesian cattle. *Schweitz. Arc-Thierheilk.*, 130, 657-672.
144. Gereben, B., Zeold, A., Dentice, M., Salvatore, D., Bianco, A.C. (2008): Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: local activation with general consequences. *Cell Mol. Life Sci.*, 65: 570-590.
145. Ginger, R., Faisser, D., Busato, A., Blum, J., Kupfer, U. (1997): Blood parameters during early lactation and their relationship to ovarian function in dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.*, 32, 313-319.
146. Gluckman, P.D., Breier, B.H., Davis, S.R. (1987): Physiology of somatotropic axis with particular reference to the ruminant. *J. Dairy Sci.* 70, 442-466.



147. Goffart S, Wiesner RJ. (2003): Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. *Exp Physiol.*, 88(1):33-40.
148. González F.D., Muiño R., Pereira V., Campos R., Benedito J.L. (2011): Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in high-yielding dairy cows. *J. Vet. Sci.*, 12(3):251-255.
149. Goya, L., de la Puente, A., Ramos, S., Martin, M.A., Escriva, F., Alvarey, C., Pascual-Leone, A.M. (2001): Regulation of IGF-I and –II by insulin in primary cultures of fetal rat hepatocytes. *Endocrinol.*, 142, 5089-5096.
150. Goya, L., de la Puente, A., Ramos, S., Martin, M.A., Escrivá, F., Pascual-Leone, A.M. (1999): Regulation of insulin-like growth factor – I and – II by glucose in primary cultures of fetal rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 274, 24633-24640.
151. Graham, T.W. (1991): Trace element deficiencies in cattle, *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 7, 153-215.
152. Green, W.L. (1991): Antithyroid compounds. U: *The Thyroid*, 6<sup>th</sup> edition, (Eds. L.E. Braverman, R.D. Utiger), J.B. Lippincott, New York, 322-335.
153. Greenwood, F.C., Hunter, W.M., Glover, J.S., (1963): The preparation of I-131-labelled human growth hormone of high specific radioactivity, *Biochem. J.*, 89, 114-123.
154. Gregorović, V., Jazbec, I., Klinkon, M., Skušek, F., Zadnik, T. (1986): Hematološki i biohemijski profil kod krava muzara u SR Sloveniji, *Veterinarski glasnik*, 40, 7-8, 485-494.
155. Gregorović, V., Skušek, F., Šenk, L., Jazbec, I. (1962): Prvi slučajevi puerperalne jetrine kome (coma hepaticum) u stadima visokoproizvodnog mliječnog goveda. *Veterinarski glasnik*, 12, 1259-1264.
156. Gross, J., Van Dorland, H.A., Schwarz, F.J., Bruckmaier, R.M. (2011): Endocrine changes and liver mRNA abundance of somatotrophic axis and insulin system constituents during negative energy balance at different stages of lactation in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 94(7):3484-3494.
157. Grum, D.E., Drackley, J.K., Younker, R.S., LaCount, D.W., Veenhuizen, J.J. (1996): Nutrition During the Dry Period and Hepatic Lipid Metabolism of Periparturient Dairy Cows. *J. Dairy Sci.*, 79, 1850-1864.

158. Grummer, R.R., Wiltbank, M.C., Fricke, P.M., Watters, R.D., Silva-Del-Rio, N. (2010): Management of dry and transition cows to improve energy balance and reproduction. *J. Reprod. Dev.*, 56, Suppl:S22-28.
159. Grummer, R.R. (1993): Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 76, 3882-3896.
160. Grummer, R.R. (1995): Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *J. Anim. Sci.*, 73, 2820-2833.
161. Grummer, R.R. (2008): Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle. *Vet. J.*, 176(1):10-20.
162. Grummer, R.R., Bertics, S. J., Lacount, D.W., Snow, J.A., Dentine M.R., Stauffacher, R.H. (1990): Estrogen induction of fatty liver in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 73, 1537-1543.
163. Guinard-Flament, J., Delamaire, E., Lemosquet, S., Boutinaud, M., David, Y. (2006): Changes in mammary uptake and metabolic fate of glucose with once-daily milking and feed restriction in dairy cows. *Reprod. Nutr. Dev.*, 46(5):589-598.
164. Guyton, A.C., Hall, J.E. (2006): *Endocrinology and Reproduction – Thyroid Metabolic Hormones*. u: *Textbook of Medical Physiology*. The Eleventh Edition, Elsevier Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, 931-943
165. Gyorfú, A., Keresztes, M., Faigl, V., Frenyo, L., Kulcsar, M., Gaal, T., Mezes, M., Zsarnovsky, A., Huszenica, Gy., Bartha, T. (2009): Glycogenic induction of thyroid hormone conversion and leptin system activation in liver of postpartum dairy cows. *Acta Vet. Hungarica*, 57, 139-146.
166. Hadsell, D.L., Baumrucker, C.R., Kensinger, R.S. (1993): Effect of elevated blood insulin-like growth factor-I (IGF-I) concentration upon IGF-I in bovine mammary secretions during the colostrum phase. *J. Endocrinol*, 137, 2, 223-230.
167. Hanaire-Broutin, H., Sallerin-Caute, B., Poncet, M.F., Tauber. M., Bastide, R., Challè, J.J., Rosenfeld, R., Tauber, J.P. (1996): Effect of intraperitoneal insulin delivery on growth hormone binding protein, insulin-like growth factor (IGF) – I, and IGF-binding protein 3 in IDDM. *Diabetologia*, 39, 1498-1504.
168. Hart, I.C., Bines, J.A., Morant, S.V., Ridley, J.L. (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, 333-345.
169. Hayirli, A. (2006): The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle. *Vet. Res. Commun.*, 30(7):749-774.
  170. Hayirli, A., Bertics, S.J., Grummer, R.R. (2002): Effects of slow-release insulin on production, liver triglyceride, and metabolic profiles of Holsteins in early lactation. *J. Dairy Sci.*, 85(9):2180-2191.
  171. Hayirli, A., Keisler, D.H., Doepel, L., Petit, H. (2011): Peripartum responses of dairy cows to prepartal feeding level and dietary fatty acid source. *J. Dairy Sci.*, 94(2):917-930.
  172. Haynes, R.C., Murad, F. (1980): Thyroid and antithyroid drugs, U: The Pharmacological basis of therapeutics 6<sup>th</sup> edition (Eds. A.G. Gilman, L.S. Goodman, A. Gilman), MacMillan Publishing Co., Inc. New York, 1397-1419.
  173. Herdt, T.H., Liesman, J.S., Gerloff, B.J., Emery, R.S. (1983): Reduction of serum triacylglycerol-rich lipoprotein concentrations in cows with hepatic lipidosis. *Am. J. Vet. Res.* 44(2):293-296.
  174. Hernandez, A., Elena Martinez, M., Fiering, S., Galton, V.A., St. Germain, D. (2006): Type 3 deiodinase is critical for the maturation and function of the thyroid axis. *J. Clin. Invest.* 116:476-484.
  175. Hershman, J.M., Van Middlesworth, L. (1962): Effect of antithyroid compounds on the deiodination of thyroxine in the rat. *Endocrinol.*, 71:94-100.
  176. Hetzel, B.S., Mano, M.T. (1989): A review of experimental studies of iodine deficiency during brain development. *Journal of Nutrition*, 119, 145-151.
  177. Heuer, C., van Straalen, W. M., Schukken, Y. H., Dirkzvager, A., Breukink, J. P. (2000): Prediction of energy balance in a high yielding dairy herd in early lactation: model development and precision. *Livestock Prod. Sci.* 65, 1-2, 91-105.
  178. Hippen, A.R., She, P., Young, J.W., Beitz, D.C., Lindberg, G.L., Richardson, L.F., Tucker, R. W. (1999): Alleviation of fatty liver in dairy cows with 14-day intravenous infusions of glucagon. *J. Dairy Sci.* 82:1139–1152.
  179. Hoffman, W.E., Solter, P.F. (2008): Diagnostic Enzymology of Domestic Animals, u: Veterinary Clinical Biochemistry of Domestic Animals (Eds. Kaneko,

- J.J., Harvey, J., Bruss, M.), 6<sup>th</sup> Edition, Academic Press, London, New York, Tokyo, 351-378.
180. Holtenius, P., Olsson, G., Björkman, C. (1993): Periparturient concentrations of insulin glucagon and ketone bodies in dairy cows fed two different levels of nutrition and varying concentrate/roughage ratios. *Zentralbl Veterinarmed A*. 40(2):118-127.
  181. Holtenuis, P. (1993): Hormonal regulation related to the development of fatty liver and ketosis. *Acta Vet. Scand., Suppl.*, 89, 55-60.
  182. Hopgood, M.F., Ballard, F.J. (1979): Regulation of protein breakdown in hepatocyte monolayers. *Ciba Found Symp.* (75):205-218.
  183. Hopkins, P. S., Wallace, A.L.C., Thorburn G. D., (1975): Thyrotropin concentrations in the plasma of cattle, sheep and foetal lambs as measured by radioimmunoassay. *J. Endocrinol.* 64:371-387.
  184. Horger, E.O., Kenimer, J.G., Azukizawa, M., Hershman, J.M., Kansal, P.C., Leaming, A.B. (1976): Failure of triiodothyronine to prevent propylthiouracil-induced hypothyroidism and goiter in fetal sheep. *Obstetrics and Gynecology*, 47, 46-49.
  185. Horvat, J., Jovanović, M. (1999): The concentration of total bilirubin and activity of AST, ALT, GLDH, CPK and AP in blood of cows before and after calving, *Acta veterinaria*, 49, 2-3, 127-138.
  186. Hossenlop, P., Seurin, D., Segovia-Quinson, B., Hardouin, S., Binoux, M., (1986): Analysis of serum insulin-like growth hormone binding proteins using Western blotting: use of the method for titration of the binding proteins and competitive binding studies. *Anal Chem*, 154, 138-143.
  187. Hossner, K.L., McCusker, R.H., Dodson, M.V. (1997): Insulin-like growth factors and their binding proteins in domestic animals. *Anim. Sci.*, 64, 1-15.
  188. Houdebine, L., Delouis, C., Devinoy, E. (1978): Post-transcriptional stimulation of casein synthesis by thyroid hormone. *Biochimie*, 60:809-812.
  189. Hough, G. M., McDowell, G.H., Annison, E.F., Williams, A.J. (1985): Glucose metabolism in hind limb muscle of pregnant and lactating ewes. *Proc. Nutr. Soc. Aust.*, 10, 97.

190. Houseknecht, K.L., Baile, C.A., Matteri, R.L., Spurlock, M.E. (1998): The biology of leptin: a review, *J. Anim. Sci.*, 76, 1405-1420.
191. Huszenicza, Gy., Kulcsar, M., Rudas, P. (2002): Clinical endocrinology of thyroid gland function in ruminants. *Vet. Med. Czech*, 47, 7, 199-210.
192. Huszenicza, Gy., Kulcsar, M., Katai, L., Balogh, O., Šamanc, H., Ivanov, I. (2004): Postpartalni nastavak ciklične funkcije jajnika, prvi estrus i ponovno oplodjenje i njihov odnos prema metabolizmu energije kod visokomlečnih krava. *Vet. glasnik*, 58, 1-2, 29-41.
193. Ibrahim, R.E., Maglad, M.A., Adam, S.E.I., Mirghani, T.E., Wasfi, I.A. (1984): The effect of altered thyroid status on lipid metabolism in Nubian goats. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 77B, 507-512.
194. Ichihara, A., Nakamura, T., Tanaka, K. (1982): Use of hepatocytes in primary culture for biochemical studies on liver functions. *Mol. Cell Biochem.*, 2;43(3):145-160.
195. Iino, S., Greer, M.A. (1961): Thyroid function in the rat during pregnancy and lactation. *Endocrinol.*, 68, 253-262.
196. Ingvarstsen, K.L., Andersen, J.B. (2000): Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on peripartureint animals. *J. Dairy Sci.*, 83, 1573-1597.
197. Itoh, N., Koiwa, M., Hatsugaya, A., Yokota, H., Taniyama, H., Okada, H., Kudo, K. (1998): Comparative analysis of blood chemical values in primary ketosis and abomasal displacement in cows. *Zentralbl. Veterinarmed*, A. 45(5):293-298.
198. Ivanov, I. (1988): Uticaj varijacija ishrane na koncentracije makroelemenata (C, Mg, Na, K i P) u krvnom serumu i mokraći krava u visokoj bremenitosti i laktaciji u intenzivnom načinu držanja, doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Veterinarski fakultet.
199. Ivanov, I., Šamanc, H., Vušanac, I., Dimitrijević, B. (2005): Metabolički profil krava, u: Zbornik radova 4. simpozijuma Ishrana, reprodukcija i zaštita zdravlja goveda - Etiopatogeneza i dijagnostika poremećaja metabolizma reprodukcije goveda, Subotica, 241-247.

200. Jaakson, H., Ling, K., Samarütel, J., Ilves, A., Kaart, T., Kärt, O. (2010): Field trial on glucose-induced insulin and metabolite responses in Estonian Holstein and Estonian Red dairy cows in two herds. *Acta Vet Scand.* 20;52:4.
201. Jack, L.J.V., Kahl, S., StGermain, D.L., Capuco, A.V. (1994): Tissue distribution and regulation of 5'-deiodinase processes in lactating rats. *J. Endocrinol.*, 142:205-215.
202. Janovick, N.A., Boisclair, Y.R., Drackley, J.K. (2011): Prepartum dietary energy intake affects metabolism and health during the periparturient period in primiparous and multiparous Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 94(3):1385-1400.
203. Jazbec, I. (1990): Klinično laboratorijska dijagnostika, Veterinarska fakulteta, Ljubljana
204. Jones, J.I., Clemmons, D.R. (1995): Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Reviews* 16, 13-34.
205. Jorristma, R. (2003): Negative energy balance in dairy cows as related to fertility. Dissertation, Utrecht University.
206. Jorritsma, R., Wensing, T., Kruip, T.A.M., Vos, P.L.A.M., Noordhuizen, J.P.T.M. (2003): Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. *Vet.Res.*, 34, 11-26.
207. Jovanović, I. (2007): Metabolizam mineralnih materija i njegovi poremećaji - Jod u: Patološka fiziologija domaćih životinja. (Ed. Božić, T.), Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, 403-407
208. Jovanović, M., Đurđević, Đ., Stojić, V. (1982): Fiziološke promene koncentracije tireoidnih hormona u krvi teladi tokom prve nedelje života. *Glas CCCXXXI Srpske akademije nauke i umetnosti, Odeljenje medicinskih nauka*, knj. 35, 34-39.
209. Jovanović, M., Stamatović, S., Šamanc, H., Radojičić, B., Ivanov, I., Damjanović, Z., Jonić, B., Arsić, B., Randelović, J., Stefanović, M., Petković, B. (1987): Prilog izučavanju metaboličkog profila krava u visokom graviditetu i puerperijumu. *Veterinarski glasnik*, 41, 6, 449-454.
210. Jovanović, M., Stojić V., Đurđević, Đ., Sinadinović, J. (1988): Puerperal changes of thyroxine and triiodothyronine serum levels in dairy cows. XIXth Annual meeting of ESNA, 29. Aug.-2. Sept., Book of abstracts, 111.

211. Kaciuba-Uscilko, H., Jessen, Feistkorn, G., Brzezinska, Z. (1987): Work performance, thermoregulation and muscle metabolism in thyroidectomised goats (*Capra hircus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 87A, 915-921.
212. Kahl, S., Bitman, J., Rumsey, T.S. (1983): Extrathyroidal conversion of thyroxine to triiodothyronine in cattle. *J. Dairy Sci.* 56(Suppl.1):235.
213. Kahl, S., Bitman, J., Rumsey, T.S. (1984): In vitro studies of the effect of propylthiouracil and ronnel on extrathyroidal conversion of thyroxine to triiodothyronine in steers. *J. Anim. Sci.*, 59, (Suppl. 1):138.
214. Kahl, S., Bitman, J., Rumsey, T.S. (1985): In vitro studies of the effect of propylthiouracil and ronnel on thyroxine 5'-monodeiodinase activity in steers. *J. Anim. Sci.*, 61:197-202.
215. Kahl, S., Capuco, A.V., Binelli, M., Vanderkooi, W.K., Tucker, H.A., Moseley, W.M. (1995): Comparison of growth hormone-releasing factor and somatotropin: thyroid status of lactating, primiparous cows. *J. Dairy Sci.*, 78,10, 2150-2158.
216. Kahl, S., Capuco, A.V., Bitman, J. (1987): Serum concentrations of thyroid hormones and extrathyroidal thyroxine-5'-deiodinase activity in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 184:144-150.
217. Kahl, S., Jack, L.J.W., Capuco, A.V. (1993): Characterization of thyroxine-5'-deiodinase in mammary tissue of the cow, sow and rat. *Livest. Prod. Sci.* 35:177–178.
218. Kalaitzakis, E., Panousis, N., Roubies, N., Giadinis, N., Kaldrymidou, E., Georgiadis, M., Karatzias, H. (2010): Clinicopathological evaluation of downer dairy cows with fatty liver. *Can. Vet. J.*, 51(6):615-622.
219. Kampmann, J.P., Hansen, J.M. (1981): Clinical pharmacokinetics of antithyroid drugs. *Clinical Pharmacokinetics*, 6, 401-428.
220. Kaneko, J.J. (2008): Thyroid function. U: *Veterinary Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (Eds. J.J. Kaneko, J. Harvey, M. Bruss,), 6<sup>th</sup> Edition, Academic Press, London, New York, Tokyo, 623-634.
221. Kaneko, J.J., Harvey, J., Bruss, M. (2008): Appendix VIII - Blood Analyte Reference Values in Large Animals, u: *Veterinary Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. (Eds. Kaneko, J.J., Harvey, J., Bruss, M.), 6<sup>th</sup> Edition, Academic Press, London, New York, Tokyo, 882-888.

222. Kaplan, M.M. (1986): Regulatory influences on iodothyronine deiodination in animal tissues. U: Thyroid hormone metabolism (Ed. G. Hennemann), M. Dekker Inc., New York, USA, 231-253.
223. Kapp, P., Pethes, Gy, Zsiros, M., Chuster, Z. (1979): Data on the pathogenesis of fatty liver disease in high-producing dairy cows. *Magyar Allatorvosok Lapja*, 34, 7, 458-461.
224. Kariya, K., Dawson, E., Neal, R.A. (1983): Toxic effects of propylthiouracil in the rat. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 40, 333-336.
225. Kasagić, D., Radojičić, B., Gvozdić, D., Mirilović, M., Matarugić, D. (2011): Endocrine and metabolic profile in Holstein and Red Holstein Heifers during peripartur period. *Acta veterinaria*, 61, 5-6, 555-565.
226. Katoh, N. (2002): Relevance of apolipoproteins in the development of fatty liver and fatty liver-related periparturum diseases in dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.*, 64(4):293-307.
227. Kessel, S., Stroehl, M., Meyer, H.H., Hiss, S., Sauerwein, H., Schwarz, F.J., Bruckmaier, R.M. (2008): Individual variability in physiological adaptation to metabolic stress during early lactation in dairy cows kept under equal conditions. *J. Anim. Sci.*, 86(11):2903-2912.
228. Kirovski, D. (2010): Ispitivanje pouzdanosti različitih metoda za određivanje stepena zamašćenja jetre krava u periodu rane laktacije, Specijalistički rad, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine.
229. Kirovski, D., Lazarević, M., Baričević-Jones, I., Nedić, O., Masnikosa, R., Nikolić, J.A. (2008): Effects of peroral insulin and glucose on circulating insulin-like growth factor-I, its binding proteins and thyroid hormones in neonatal calves. *Can. J. Vet. Res.*, 73, 253-278.
230. Knapp, J.R., Freetly, H.C., Reis, B.L., Calvert, C.C., Baldwin, R. (1992): Effects of somatotropin and substrate on patterns of liver metabolism in lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 75, 1025-1035.
231. Köhrle, J. (2000): The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action, *Cellular and Molecular Life Sciences* 57, 1853-1863.



232. Kolaczynski, J.W., Nyce, M.R., Considine, R.V., Boden, G., Nolan, J.J., Henry, R., Mudaliar, S.R., Olefsky, J., Caro, J.F. (1996): Acute and chronic effect of insulin on leptin production in humans. *Diabetes* 45, 699-701.
233. Koller, A., Reist, M., Blum, J.W., Küpfer, U. (2003): Time empty and ketone body status in the early postpartum period of dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.*, 38(1):41-49.
234. Kotz, H.L., Herrman, W. (1961): A review of the Endocrine Induction of Human Ovulation. *Fertil. Steril.*, 12, 196-207.
235. Kovačević, B. (2004): Hormonalni i metabolički status visoko-mlečnih krava u peripartalnom periodu, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine.
236. Kovačević, M. (2000): Funkcionalno stanje jetre i hormonalni status u krava različite uhranjenosti u graviditetu i ranoj laktaciji. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine.
237. Kovačević, M., Šamanc, H., Nikolić, J.A., Bugarski, D., Jovičin, M., Košarčić, S. (2005): Hormonalni status i uhranjenost mlečnih krava u peripartalnom periodu. Zbornik radova 4. simpozijuma Ishrana, reprodukcija i zaštita zdravlja goveda – Etiopatogeneza i dijagnostika poremećaja metabolizma reprodukcije goveda, Subotica, 139-146.
238. Kudlác, E., Sakour, M., Canderle, J. (1995): Metabolic profile in cows in the peripartum period with and without retained placenta. *Vet. Med. (Praha)*, 40(7):201-207.
239. Kuhla, B., Albrecht, D., Kuhla, S., Metges, C.C. (2009): Proteome analysis of fatty liver in feed-deprived dairy cows reveals interaction of fuel sensing, calcium, fatty acid, and glycogen metabolism. *Physiol. Genomics*, 37(2):88-98.
240. Kuhla, B., Nürnberg, G., Albrecht, D., Görs, S., Hammon, H.M., Metges, C.C. (2011): Involvement of skeletal muscle protein, glycogen, and fat metabolism in the adaptation on early lactation of dairy cows. *J. Proteome Res.*, 10(9):4252-4262.
241. Kunal, B.K., Parloop, A.B., Shah, J.S. (2012): Association between altered thyroid state and insulin resistance. *J. Pharmacol. Pharmacother.*, 3, 156-160.

242. Kunz, P.L., Blum, J.W., Hart, I.C., Bickel, H., Landis, J. (1985): Effects of different energy intakes before and after calving on food intake, performance and blood hormones and metabolites in dairy cows. *Anim. Prod.*, 40, 219-231.
243. Lackey, B.R., Gray, S.L., Henricks, D.M. (1999): The insulin-like growth factor (IGF) system and gonadotropin regulation: actions and interactions. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 10, 201-217.
244. LeBlanc, S. (2010): Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *J. Reprod. Dev.*, 56 Suppl:S29-35.
245. Leturque, A., Haugel, S., Fed, S., Girard, J. (1987): Glucose metabolism in pregnancy. *Bol. Neonate*, 51, 64-69.
246. Liu, Q., Wang, C., Yang, W.Z., Guo, G., Yang, X.M., He, D.C., Dong, K.H., Huang, Y.X. (2010): Effects of calcium propionate supplementation on lactation performance, energy balance and blood metabolites in early lactation dairy cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)*, 94(5):605-614.
247. Loiselle, M.C., Ster, C., Talbot, B.G., Zhao, X., Wagner, G.F., Boisclair, Y.R., Lacasse, P. (2009): Impact of postpartum milking frequency on the immune system and the blood metabolite concentration of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 92(5):1900-1912.
248. Lomander H, Frössling J, Ingvarsten KL, Gustafsson H, Svensson C. (2012): Supplemental feeding with glycerol or propylene glycol of dairy cows in early lactation-Effects on metabolic status, body condition, and milk yield. *J Dairy Sci.* 95(5):2397-2408.
249. Lord, G.M., Matarese, G., Howard, J.K., Baker, R.J., Bloom, S.R., Lecher, R.I. (1998): Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394, 897-900.
250. Lotthammer, K.H. (1991): Einfüsse und Folgen unausgeglichener Fütterung auf Gesundheit und Fruchtbarkeit des Milchschrindes, *Zbornik radova XX seminara za inovaciju znanja veterinara, Beograd*
251. Lucy, M.C. (2000): Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle, *J. Dairy Sci.*, 83, 1635-1647.
252. Lucy, M.C., Beck, J., Staples, C.R., Head, H.H., De La Sota, R.L., Thatcher, W.W. (1992): Follicular dynamics, plasma metabolites, hormones and insulin-like

- growth factor I (IGF-I) in lactating cows with positive or negative energy balance during the preovulatory period. *Reprod. Nutr. Dev.* 32, 331-341.
253. Maciel, S.M., Chamberlain, C.S., Wettemann, R.P., Spicer, L.J. (2001): Dexametasone influences endocrine and ovarian function in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 84, 1998-2009.
254. Maes, M., Underwood, L.E., Ketelslegers, J.M. (1986): Low serum somatomedin-C in insulin-dependent diabetes: evidence for postreceptor mechanisms. *Endocrinol.*, 118, 377-382.
255. Maurer, R.A., (1982): Relationship between estradiol, ergocryptine and thyroid hormone: effect on prolactin synthesis and prolactin messenger ribonucleotic acid levels. *Endocrinol.*, 110, 1515-1520.
256. Mazur, A., Ayrault-Jarrier, M., Chilliard, Y., Rayssiguier, Y. (1992): Lipoprotein metabolism in fatty liver dairy cows. *Diabete. Metab.*, 18(1 Pt 2):145-149.
257. McCusker, R.H., Cohick, W.S., Busby, W.H., Clemmons, D.R. (1991): Evaluation of the developmental and nutritional changes in porcine IGFBP-1 and IGFBP-2 serum levels by immunoassay. *Endocrinol.*, 129, 2631-2637.
258. McGuire, M.A., Bauman, D.E., Dwyer, D.A., Cohick, W.S. (1995): Nutritional modulation of the somatotropin/insulin-like growth factor system: response to feed deprivation in lactating cows. *J. Nutr.*, 125 493-502.
259. McGuire, M.A., Beede, D.K., Collier, R.J., Buonomo, F.C., DeLorenzo, M.A., Wilcox, C.J., Huntington, G.B., Reynolds, C.K. (1991a): Effects of acute thermal stress and amount of feed intake on concentrations of somatotropin, insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II, and thyroid hormones in plasma of lactating Holstein cows. *J. Anim. Sci.*, 69, 2050-2056.
260. McGuire, M.A., Cohick, W.S., Clemmons, D.R., Bauman, D.E. (1991b): Effects of protein and energy restriction on concentrations of IGF and IGF binding protein-2 (IGFBP-2) in lactating cows treated with somatotropin (bST). U: 2<sup>nd</sup> Int. Symp. Insulin-Like Growth Factors/somatomedins, Book of Proceedings, Abstr., 148.
261. McGuire, M.A., Vicini, J.L., Bauman, D.E., Veenhuizen, J.J. (1992): Insulin-like growth factors and binding proteins in ruminants and their nutritional regulation. *J. Anim. Sci.*, 70, 2901-2910

262. McNamara, J.P., Hillers, J K. (1986): Adaptations in lipid metabolism of bovine adipose tissue in lactogenesis and lactation. *J. Lipid Res.*, 27,150-157.
263. Miettinen, P.V. (1990): Metabolic balance and reproductive performance in Finnish dairy cows. *Zentralbl. Veterinarmed. A.* 37(6):417-424.
264. Morrow, D.A. (1976): Fat cow syndrome. *J. Dairy Sci.*, 59, 9, 1626-1629.
265. Murondoti, A., Jorritsma, R., Beynen, A.C., Wensing, T., Geelen, M.J. (2004): Activities of the enzymes of hepatic gluconeogenesis in periparturient dairy cows with induced fatty liver. *J. Dairy Res.*, 71(2):129-134.
266. Murphy, L.J., Bell, G.I., Friesen, H.G. (1987): Tissue distribution of insulin-like-growth factor – I and -II messenger ribonucleotic acid in the adult rat. *Endocrinol.*, 120, 1279-1282.
267. Muylle, E, Van den Hende, C., Sustronck, B., Deprez, P. (1990): Biochemical profiles in cows with abomasal displacement estimated by blood and liver parameters. *Zentralbl. Veterinarmed. A.* 37(4):259-263.
268. Myers, D.A., Hanson, K., Mlynarczyk, M., Kaushal, K.M., Ducsay, C. (2008): Long-term hypoxia modulates expression of key genes regulating adipose function in the late-gestation ovine fetus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294: R1312-R1318.
269. Nesbitt, R.E.L., Abdul-Karim, R.W., Prior, J.T., Shelley, T.F., Rourke, J.E. (1967): Study of the effect of experimentally induced endocrine insults upon pregnant and nonpregnant ewes. *Fertility and Sterility*, 18, 739-758.
270. Nikolić, J.A. (1996): Hormonalna regulacija prometa energije u peripartalnom periodu krava. *Zbornik radova 2. simpozijuma "Ishrana, reprodukcija i zaštita goveda"*, Svilajnac, 92-106,
271. Nikolić, J.A., Nedić O., Gavrović, M., Stojanović, D., Živković, B. (1998): Different serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) binding characteristics accompany reduced growth associated with low thyroid hormone and/or low total IGF-I status in young pigs, *Acta Veterinaria*, 48, 3-18.
272. Nikolić, J.A., Ratković, M., Nedić, O. (1996): Determination of insulin-like growth factor – I by radioimmunoassay. *J. Serb. Chem. Soc.*, 61, 1149-1157.

273. Nikolić, J.A., Šamanc, H., Kovačević M., Đoković, R., Bugarski, D. (2000): Hormonal status in cows during the peripartal period. *Lucrari Stiintifice, Timisoara*, 33, 1-18.
274. Nikolić, J.A., Šamanc, H., Kovačević, M., Bugarski, D., Masnikosa, R. (2001): Serum concentrations of insulin-like growth factors and thyroid hormones in healthy and ketotic dairy cows during the puerperium. *Acta Veterinaria*, 51, 2-3, 73-88.
275. Nishimura, K., Shimizu, S., Urata, H., Aoyama, Y., Kojima, T., Matta, M., Kawabata, Y., Uchiyama, M., Sakuragi, K., Ohnishi, Y. (2000): The relationship between serum Insulin-like Growth Factor – I and changes in body weight in early-lactating cows. *J. Vet. Epidemiol. (Jpn.)*, 2, 89-96.
276. Nixon, D.A., Akasha, M.A., Anderson, R.R. (1988): Free and total thyroid hormones in serum of Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 71, 5, 1152-1160.
277. Oikawa, S., Katoh, N. (2002): Decreases in serum apolipoprotein B-100 and A-I concentrations in cows with milk fever and downer cows. *Can. J. Vet. Res.*, 66(1):31-34.
278. Oikawa, S., Mizunuma, Y., Iwasaki, Y., Tharwat, M. (2010): Changes of very low-density lipoprotein concentration in hepatic blood from cows with fasting-induced hepatic lipidosis. *Can. J. Vet. Res.*, 74(4):317-320.
279. Okajima, F. Ui, M. (1979): Metabolism of glucose in hyper- and hypothyroid rats in vivo. Glucose-turnover values and futile cycle activities obtained with <sup>14</sup>C and <sup>3</sup>H-labeled glucose. *Biochemical Journal*, 182, 565-575.
280. Oppenheimer, J.H. (1979): Thyroid hormone action at the cellular level. *Science*, 203, 971-979.
281. Ospina, P.A., Nydam, D.V., Stokol, T., Overton, T.R. (2010b): Evaluation of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *J. Dairy Sci.*, 93(2):546-554.
282. Ospina, P.A., Nydam, D.V., Stokol, T., Overton, T-R. (2010a): Associations of elevated nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. *J. Dairy Sci.*, 93(4):1596-1603.

283. Pantić, V., Sekulić, M. (1980): Dugotrajno delovanje estradiola na štitastu žlezdu, IV Jugoslovenski simpozijum o štitastoj žlezdi, Zlatibor, 31-34.
284. Park, C.S., Lindberg, G.L. (2004): The Mammary Gland and Lactation. U: *Dukes Physiology of Domestic Animals*, (Ed. W.O. Reece), 12<sup>th</sup> Edition, Cornell University Press, Ithaca, London, 720-741.
285. Parkinson, T.J., Follet, B.K. (1994): Effect of thyroidectomy upon seasonality in rams. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101, 51-58.
286. Pestevšek, U., Klemenc, N., Vospernik, P., Žust, J. (1980): Serumske proteinske frakcije kod krava u visokoj gravidnosti i puerperijumu. *Veterinarski glasnik*, 34, 6, 555-561.
287. Peterson, M.E. (1989): Treatment of feline hyperthyroidism. U: "Current veterinary therapy X: Small animal practice, (Ed. R.W. Kick), WB Saunders Company, Philadelphia, 1002-1008.
288. Pethes, G., Bokori, J., Rudas, P., Frenyo, V.L., Fekete, S. (1985): Thyroxine, Triiodothyronine, reverse-triiodothyronine and other psychological characteristic of periparturient cows feed restricted energy. *J. Dairy Sci.*, 68, 1148-1154.
289. Petterson, J.A., Dunshea, F.R., Ehrhardt, R.A., Bell, A.W (1993): Pregnancy and undernutrition alter glucose metabolic responses to insulin in sheep. *J. Nutr.* 123, 1286-1295.
290. Petterson, J.A., Slepetic, R., Ehrhardt, R.A., Dunshea, F.R., Bell, A.W. (1994): Pregnancy but not moderate undernutrition attenuates insulin suppression on fat mobilization in sheep. *J. Nutr.* 124, 2431-2436.
291. Pezzi, C., Accorsi, P.A., Vigo, D., Govani, N., Gaiani, R. (2003): 5' deiodinase activity and circulating thyronines in lactating cows. *J. Dairy Sci.*, 86, 152-158,
292. Piccione, G., Messina, V., Schembari, A., Casella S., Giannetto, C., Alberghina, D. (2011): Pattern of serum protein fractions in dairy cows during different stages of gestation and lactation. *J. Dairy Res.*, 78(4):421-425.
293. Potter, B.J., Mano, M.T., Belling, G.B., McIntosh, G.H., Hua, C., Cragg, B.G., Marshall, J., Welby, M.L., Hetzel, B.S. (1982): Retarded fetal brain development resulting from severe dietary iodine deficiency in sheep. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 8, 303-313.

294. Prodanović, R., Kirovski, D., Jakić-Dimić, D., Vujanac, I., Kureljušić, B. (2010): Telesna kondicija i pokazatelji energetskog statusa krava u visokom graviditetu i ranoj fazi laktacije. *Veterinarski glasnik*, 64, 1-2, 43-52.
295. Quiroz-Rocha, G.F., LeBlanc, S.J., Duffield, T.F., Wood, D., Leslie, K.E., Jacobs, R.M. (2009): Reference limits for biochemical and hematological analytes of dairy cows one week before and one week after parturition. *Can. Vet. J.*, 50(4):383-388.
296. Radcliff, R.P., McCormack, B.L., Crooker, B.A., Lucy, M.C. (2003): Plasma hormones and expression of growth hormone receptor and insulin/like growth factor-I mRNA in hepatic tissue of periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 86, 3920-3926.
297. Radojičić, S. (1995): Uticaj I-alfa-OHD<sub>3</sub> na koncentraciju Ca i P u krvnom serumu krava u visokom graviditetu i ranom puerperijumu. Magistarska teza, Univerzitet u Beogradu, Veterinarski fakultet.
298. Ramakrishna, C., Prasad, M.C., Lonkar, P.S., Singh, S.K. (1994): Clinico-biochemical observations on experimental hypothyroidism in goats. *Indian Veterinary Journal*, 71, 1107-1011.
299. Rayssiguier, Y., Mazur, A., Gueux, E., Reid, I.M., Roberts, C.J. (1988): Plasma lipoproteins and fatty liver in dairy cows. *Res. Vet. Sci.*, 45(3):389-393.
300. Reddy, I.J., Varshney, V.P., Sanwal, P.C., Agarwal, N., Pande, J.K. (1996): Peripheral plasma oestradiol-17 $\beta$  and progesterone levels in female goats induced to hypothyroidism. *Small Ruminant Research*, 22, 149-154.
301. Reid, I.M., Roberts, C.J., Baird, D.G. (1980): The effects of underfeeding during pregnancy of lactation on structure and chemistry of bovine liver and muscle. *J. Agricultural Sci.*, 94, 239-245.
302. Reist, M., Koller, A., Busato, A., Küpfer, U., Blum, J.W. (2000): First ovulation and ketone body status in the early postpartum period of dairy cows. *Theriogenology*, 54(5):685-701.
303. Renaville, R., Hammadi, M., Portelle, D. (2002): Role of somatotrophic axis in the mammalian metabolism. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 23, 351-360.
304. Rhind, S.M., McMillen, S.R. (1996): Effects of methylthiouracil treatment on the growth and moult of cashmere fibre in goats. *Anim. Sci.*, 62, 513-520.

305. Richards, M.W., Spicer, L.J., Wettemann, R.P. (1995): Influence of diet and ambient temperature on bovine serum insulin-like growth factor-I and thyroxine: relationships with non-esterified fatty acids, glucose, insulin, luteinizing hormone and progesterone. *Anim. Reprod. Sci.*, 37, 269-279
306. Riis, P.M., Madsen, A. (1985): Thyroxine concentrations and secretion rates in relation to pregnancy, lactation and energy balance in goats. *J. Endocrinol.*, 107, 3, 421-427.
307. Roberts, T., Chapinal, N., Leblanc, S.J., Kelton, D.F., Dubuc, J., Duffield, T.F. (2012): Metabolic parameters in transition cows as indicators for early-lactation culling risk. *J. Dairy Sci.*, 95(6):3057-3063.
308. Roil, M.R., Suckling, G.W., Mattingley, J. (1974) Serum total protein and albumin levels in grazing sheep. *New Zealand Veterinary Journal*, 22(12): 232-236
309. Romo, G.A., Elsasser, T.H., Kahl, S., Erdman, R.A., Casper, D. P. (1997): Dietary fatty acids modulate hormone responses in lactating cows: Mechanistic role for 5'-deiodinase activity in tissue. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 14:409–420.
310. Ronge, H., Blum, J. (1989): Insulin-like growth factor I responses to recombinant bovine growth hormone during feed restriction in heifers. *Acta Endocrinol. (Coppenh.)*, 120, 735-744
311. Rosenberger, G. (1979): Clinical examination of cattle. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
312. Rudas, P., Rónai, Z., Bartha T. (2005): Thyroid hormone metabolism in the brain of domestic animals. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 29, 88-96.
313. Rukkwamsuk, T., Kruij, T.A., Wensing, T. (1999a): Relationship between overfeeding and overconditioning in the dry period and the problems of high producing dairy cows during the postparturient period. *Vet. Q.*, 21(3):71-77.
314. Rumsey, T.S., Bitman, J., Tao, H. (1983a): Changes in plasma concentration of thyroxine, triiodothyronine, cholesterol and total lipid in beef steers fed ronnell. *J. Anim. Sci.*, 56, 125-131.
315. Rumsey, T.S., Bitman, J., Tao, H., Kozak, A.S. (1985): Changes in plasma concentrations of thyroxine and triiodothyronine in beef steers fed different levels of propylthiouracil. *J. Anim. Sci.*, 60:1454-1462.



316. Rumsey, T.S., Kahl, S., Bitman, J. (1983b): Relationship of daily gain to plasma T4 and T3 concentrations in feedlot steers. *J. Anim. Sci.*, 57 (Suppl. 1): 131.
317. Rutter, L.M., Snopek, R., Manns, J.G. (1989): Serum concentrations of IGF-I in postpartum beef cows. *J. Anim. Sci.*, 67, 2060-2066.
318. Ryder, M.L. (1979): Thyroxine and wool follicle activity. *Animal Production*, 28, 109-114.
319. Saladin, R., De Vos, P., Guerre-Millo, M., Leturque, A., Girard, J., Staels, B., Auwerx, J. (1995): Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377, 527-529.
320. Šamanc, H. (2009): Bolesti organa za varenje goveda, Naučna, Beograd.
321. Šamanc, H., Damjanović, Z., Nikolić, J.A., Radojičić, B., Anđelković, M., Lekić, N. (1993): Endokrina regulacija metaboličkih procesa kod krava u graviditetu i laktaciji. *Vet. glasnik*, 47, 4-5, 319.
322. Šamanc, H., Jovanović, M., Kovačević, M., Đoković, R., Jovičin, M., Ivanov, I. (1988): Relation between levels of particular hormones in blood and histological changes in the liver of recently calved healthy and ketotic cows. X Middle-European Buiatrics congress. Book of Proceedings, May 21-23, Siofok, Hungary, 266-270.
323. Šamanc, H., Jovanović, M.J., Damjanović, Z. (1996): Savremena shvatanja etiologije nastanka puerperalne "jetrine" kome krava, Zbornik plenarnih referata i kratkih sadržaja radova 2. simpozijuma "Ishrana, reprodukcija i zaštita zdravlja goveda", Svilajnac, 146-155.
324. Šamanc, H., Kirovski, D., Stojić, V., Stojanović D., Vujanac, I., Prodanović, R., Bojković-Kovačević, S. (2011): Application of the metabolic profile test in the prediction and diagnosis of fatty liver in holstein cows. *Acta veterinaria*, 61, 5-6, 543-553.
325. Šamanc, H., Nikolić, J.A., Đoković, R., Kovačević M., Damjanović, Z., Ivanov, I., Bojkovski, J. (2000): Relation between peripheral hormone levels and liver morphology in health and ketotic cows. *Lucrarile stintifice, Medicina Veterinaria*, 33, Timisoara, 25-28.
326. Šamanc, H., Sinovec, Z., Adamović, M., Grubić, G. (2005a): Uloga ishrane u etiopatogenezi poremećaja metabolizma visoko-mlečnih krava, Zbornik radova 4.

- simpozijuma Ishrana, reprodukcija i zaštita zdravlja goveda – Etiopatogeneza i dijagnostika poremećaja metabolizma reprodukcije goveda, Subotica, 3-19.
327. Šamanc, H., Sinovec, Z., Cernescu, H. (2005b): Osnovi poremećaja prometa energije visoko-mlečnih krava, Zbornik radova 4. simpozijuma Ishrana, reprodukcija i zaštita zdravlja goveda – Etiopatogeneza i dijagnostika poremećaja metabolizma reprodukcije goveda, Subotica, 89-101.
328. Šamanc, H., Stojić, V., Kirovski, D., Jovanović, M., Cernescu, H., Vujanac, I. (2010): Thyroid hormones concentrations during the mid-dry period: an early indicator of fatty liver in Holstein – Friesian dairy cows. - Journal of Thyroid Research, doi:10.4061/2010/897602
329. Šamanc, H., Stojić, V., Kovačević, B., Vujanac, I. (2005c): Hormonalni status visokomlečnih krava, Zbornik radova 4. simpozijuma Ishrana, reprodukcija i zaštita zdravlja goveda – Etiopatogeneza i dijagnostika poremećaja metabolizma reprodukcije goveda, Subotica, 277-284.
330. Šamanc, H., Vuković, D., Damjanović, Z. (1991): Ishrana krava i promene u endokrinoj regulaciji metaboličkih funkcija. Zbornik predavanja 20. seminara za inovaciju znanja veterinara. Beograd.
331. Sano, H., Narahara, S., Kondo T., Takahashi, A., Terashima, Y. (1993): Insulin responsiveness to glucose and tissue responsiveness to insulin during lactation in dairy cows. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 10(3):191-197.
332. Santini, F., Chopra, I.J., Hurd, R.E., Chua Teco, G.N. (1992): A study of characteristics of hepatic iodothyronine 5'-monodeiodinase in various vertebrate species. *Endocrinology* 131, 830-834.
333. Savić, Đ., Jotanović S., Drinić M., Vekić, M. (2011): Neki biohemijski parametri krvi krava gatačke rase iz regije Gacko, *Savremena poljoprivreda*, 60, 1-2, 31-37.
334. Sawhney, R.C., Rastogi, I., Rastogi, K. (1978): Effects of estrogens on thyroid function. II Alterations in plasma thyroid hormone levels and their metabolism, *Metabol.*, 27, 279-288.
335. Schams, D., Berisha, B., Kosmann, M., Einspaner, R., Amselgruber, W.M. (1999): Possible role of growth hormone, IGFs, and IGF-binding proteins in the regulation of ovarian function in large farm animals. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 17, 279-285.

336. Schwalm, J.W., Schultz, L.H. (1976): Relationship of insulin concentration to blood metabolites in the dairy cow. *J. Dairy Sci.*, 59(2):255-261.
337. Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D. Jr, Seeley, R. J., Baskin, D. G. (2000): Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404, 661-671.
338. Scott, C.D., Baxter, R.C. (1986): Production of insulin-like growth factor I and its binding protein in rat hepatocytes cultured from diabetic and insulin-treated diabetic rats. *Endocrinol.*, 119, 2346-2352.
339. Seifi, H.A., Leblanc, S.J., Leslie, K.E., Duffield, T.F. (2011): Metabolic predictors of post-partum disease and culling risk in dairy cattle. *Vet. J.*, 188(2):216-220.
340. Seimya, Y., Ohshima, K., Itoh, H., Ogasawara, N., Matsukida, Y., Yuita, K. (1991): Epidemiological and pathological studies on congenital diffuse hyperplastic goiter in calves. *Journal of Veterinary Medical Science*, 53, 989-994.
341. Sekulić, M. (1985): Štitaste žlezde pacova i svinja neonatalno tretiranih polnim steroidima. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Veterinarski fakultet.
342. Sharma, B.K., Vandehar, M.J., Ames, N.K. (1994): Expression of insulin-like growth factor-I in cows at different stages of lactation and in late lactation cows treated with somatotropin. *J. Dairy Sci.*, 77, 2232-2241.
343. Sinadinović, J., Savin, S., Cvejić, D. (1996): Funkcija tireoideje i nutritivni značaj joda u goveda. Zbornik plenarnih referata i kratkih sadržaja radova 2. simpozijuma „Ishrana, reprodukcija i zaštita zdravlja goveda – Nova saznanja o uticaju energetske prometa na proizvodna i reproduktivna svojstva goveda“, Svilajnac, 1.-5. oktobra 1996, 107-117.
344. Slobodzinski, A.B., Brzezinska-Slobodzinska, E., Styczynska, E., Szejnoga, M. (1999): Presence of thyroxine deiodinase in mammary gland: Possible modulation of the enzyme-deiodinating activity by somatotropin. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 17:161-169.
345. Soler-Argilago, C., Russell, R. L., Werner, H. V., Heimberg, M. (1978): A possible role of calcium in the action of glucagon, cAMP and dibutyryl c AMP on the metabolism of free fatty acids by rat hepatocytes. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, 85, 246-254.

346. Spicer, L.J. (2001): Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. *Domestic Animal Endocrinol.*, 21, 251-270.
347. Spicer, L.J., Echternkamp, S.E. (1995): The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 12, 223-245.
348. Spicer, L.J., Tucher, W.B., Adams, G.D. (1990): Insulin-like growth factor in dairy cows: Relationships among energy balance, body condition, ovarian activity, estrus behaviour. *J. Dairy Sci.*, 73, 929-937.
349. Squires, E.J. (2003): Thyroid hormones. u: *Applied animal Endocrinology*, CABI Publishing, CAB International, Wallingford, UK, 96-99.
350. St Germaine, D.L. (1994): Iodothyronine deiodinases. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 5, 36-42.
351. Stamatović, S., Šamanc, H., Damnjanović, Z., Vuković, D., Jakšić, Z. (1990): Savremen pristup utvrđivanju metaboličkog stanja visoko-mlečnih krava, Zbornik predavanja XIX seminara za inovaciju znanja veterinarara, Beograd, 35-44.
352. Stamatović, S., Šamanc, H., Jovanović, M. (1983): Uprerodo ispitivanje koncentracije glikoze u krvi *v. auricularis magna* i *v. subcutanea abdominis* mlečnih krava. *Vet. glasnik*, 37, 4, 273-256.
353. Steen, A., (2001): Field study of dairy cows with reduced appetite in early lactation: clinical examinations, blood and rumen fluid analyses. *Acta Vet Scand.*, 42(2):219-228.
354. Steen, A., Grønstøl, H., Torjesen, P.A. (1997): Glucose and insulin responses to glucagon injection in dairy cows with ketosis and fatty liver, *Zentralbl. Veterinarmed. A.*, 44(9-10):521-530.
355. Stengärde, L., Tråvén, M., Emanuelson, U., Holtenius, K., Hultgren, J., Niskanen, R. (2008): Metabolic profiles in five high-producing Swedish dairy herds with a history of abomasal displacement and ketosis. *Acta Vet Scand.* 7;50:31.
356. Stewart, R.E., Stevenson, J.S., Minton, J.E. (1994): Serum hormones during the estrous cycle and estrous behavior in heifers after administration of propylthiouracil and thyroxine. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 11:1-12.

357. Stojević, Z., Milinković-Tur, S., Zdelar-Tuk, M., Piršljin, J., Galić, G., Bačić, I. (2002) Blood minerals and metabolites as an indices of metabolic disturbances in dairy cattle. *Praxis vet*, 50, 261-264.
358. Stojević, Z., Piršljin J., Milinković-Tur S., Zdelar-Tuk M., Beer Ljubić B. (2005): Activities of AST, ALT and GGT in clinically healthy dairy cows during lactation and in the dry period. *Veterinarski arhiv*, 75 (1), 67-73.
359. Stojić, V., Gvozdić, D., Kirovski, D., Nikolić, J.A., Huszenicza, Gy., Šamanc, H., Ivanov, I. (2001): Serum thyroxine and triiodothyronine concentrations prior to and after delivery in primiparous Holstein cows. *Acta Veterinaria*, 51, 1, 3-8.
360. Strang, B.D., Bertics, S.J., Grummer, R.R., Armentano, L.E. (1998): Effect of long-chain fatty acids on triglyceride accumulation, gluconeogenesis, and ureagenesis in bovine hepatocytes. *J. Dairy Sci.*, 81(3):728-739.
361. Sugden, M.C., Liu, Y.L., Holness, M.J. (1990): Glucose utilization by skeletal muscles in vivo in experimental hyperthyroidism in the rat. *Biochem.*, 15;271(2):421-425.
362. Sutton, D.J., Oldham, D.J., Hart, C.I. (1980): Product of digestion, hormones and energy utilization in milking cows given concentrates containing varying proportions of barley or maize. *Proceeding of the Eight Symposium on Energy Metabolism* (Ed. L.E. Mount), Butterworths, London, 303-306.
363. Symonds, M.E., Andrews, D.C., Buss, D.S., Clarke, L., Lomax, M.A. (1996): Influence of rearing temperature on lung development following methimazole treatment of postnatal lambs. *Experimental Physiology*, 81, 673-683.
364. Tabachnick, M., Korcek, L. (1986): Effect of long-chain fatty acids on the binding of thyroxine and triiodothyronine to human thyroxine-binding globulin. *Biochimica and Biophysica Acta*, 881, 292-296.
365. Taljaard, T.L. (1993): Cabbage poisoning in ruminants. *Journal of the South African Veterinary Association*, 64, 96-100.
366. Tata, J.R., Ernster, L., Lindberg, L., Arrheniks, E., Pederson, S., Hedman, R. (1963): The action of thyroid hormones at the cell level. *Biochem. J.*, 86, 408-428.
367. Taurog, A., (1996): Hormone synthesis: Thyroid iodine metabolism. U: *The Thyroid*, 7<sup>th</sup> Edition (Eds.L.E. Braverman, R.D. Utiger), Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, 47-81.

368. Teixeira, S.S., Tamrakar, A.K., Goulart-Silva, F., Serrano-Nascimento, C., Klip, A., Nunes, M.T. (2012): Triiodothyronine (T3) acutely stimulates glucose transport into L6 muscle cells without increasing surface GLUT4, GLUT1 or GLUT3., *Thyroid*, u štampi, doi:10.1089/thy.2011-0422.
369. Tennant, B.C., Center, S.A. (2008): Hepatic function. u: *Veterinary Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. (Eds. J.J. Kaneko, J. Harvey, M. Bruss), 6<sup>th</sup> Edition, Academic Press, London, New York, Tokyo, 379-412.
370. Thissen, J.P., Ketelslegers, J.M., Underwood, L.E. (1994): Nutritional regulation of the Insulin-like growth factors. *Endocr. Rev.*, 15, 80-101.
371. Thomas, G.B., Mercer, J.E., Karalis, T., Rao, A., Cummins, J.T., Clarke, I.J. (1990): Effect of restricted feeding on the concentrations of growth hormone (GH), gonadotropins, and prolactin (PRL) in plasma, and on the amounts of messenger ribonucleic acid for GH, gonadotropin subunits, and PRL in the pituitary glands of adult ovariectomised ewes. *Endocrinol.*, 126, 1361-1367.
372. Thrift, T.A., Bernal, A., Lewis, A.W., Neuendorff, D.A., Willard, C.C., Randel, R.D. (1999a): Effects of induced hypothyroidism or hyperthyroidism on growth and reproductive performance of Brahman heifers. *J. Anim. Sci.* 77:1833-1843.
373. Thrift, T.A., Bernal, A., Lewis, A.W., Neuendorff, D.A., Willard, C.C. Randel, R.D. (1999b): Effects of induced hypothyroidism on weight gains, lactation, and reproductive performance of primiparous Brahman cows. *J. Anim. Sci.* 77:1844-1850.
374. Tiirats, T. (1997): Thyroxine, triiodothyronine and reverse-triiodothyronine concentrations in blood plasma in relation to lactational stage, milk yield, energy and dietary protein intake in Estonian dairy cows. *Acta Vet., Scand.*, 38, 4, 339-348.
375. Tucker, H.A. (1985): *Endocrine and neural control of the mammary gland. U: Lactation*. (Ed. B.L. Larson), Iowa State University Press, Ames, 39.
376. Van den Top, A.M., Van Tol, A., Jansen, H., Geelen, M.J., Beynen, A.C. (2005): Fatty liver in dairy cows post partum is associated with decreased concentration of plasma triacylglycerols and decreased activity of lipoprotein lipase in adipocytes. *J. Dairy Res.* 72(2):129-137.

377. Van den Top, A.M., Wensing, T., Geelen, M.J., Wentink, G.H., van't Klooster, A.T., Beynen, A.C. (1995): Time trends of plasma lipids and enzymes synthesizing hepatic triacylglycerol during postpartum development of fatty liver in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 78, 2208-2220.
378. Van Knegsel, A.T., Van den Brand, H., Dijkstra, J., Kemp, B. (2007a): Effects of dietary energy source on energy balance, metabolites and reproduction variables in dairy cows in early lactation. *Theriogenology*, 68, Suppl 1:S274-180.
379. Van Knegsel, A.T., van den Brand, H., Graat, E.A., Dijkstra, J., Jorritsma, R., Decuyper, E., Tamminga, S., Kemp, B. (2007b): Dietary energy source in dairy cows in early lactation: metabolites and metabolic hormones. *J. Dairy Sci.*, 90(3):1477-1485.
380. Van Steenberghe, W., Fevery, J., De Vos, R., Leyten, R., Heirwegh, K.P., De Groote, J. (1989): Thyroid hormones and the hepatic handling of bilirubin. I. Effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on the hepatic transport of bilirubin mono- and diconjugates in the Wistar rat. *Hepatology*, 9:314-321.
381. Varagić, V., Milošević, M. (2008): Farmakologija hormona – Antitireoidni lekovi. u: Farmakologija, Dvadesetdrugo izdanje, Elit-Medica, Beograd, 476-478.
382. Vasquez-Añon, M., Bertics, S., Luck, M., Grummer, R. (1991): Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 74, 4238-4253.
383. Vazquez-Añon, M., Bertics, S., Luck, M., Grummer, R.R., Pinheiro, J. (1994): Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 77(6):1521-1528.
384. Vernon, R.G. (2005): Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and development of fatty liver. *J. Dairy Res.*, 72, 4, 460-469.
385. Vernon, R.G., Barber, M.C., Finley, E. (1991): Modulation of the activity of acetyl-CoA carboxylase and other lipogenic enzymes by growth hormone, insulin and dexametasone in sheep adipose tissue and relationship to adaption to lactation. *Biochem. J.*, 274, 543-548.
386. Vernon, R.G., Clegg, R.A., Flint, D.J. (1981): Metabolism of sheep adipose tissue during pregnancy and lactation. Adaption and regulation. *Biochem. J.* 200, 307-314.

387. Vernon, R.G., Faulkner, A., Hay, W.W.Jr., Calvert, D.T., Flint, D.J. (1990): Insulin resistance of hind-limb tissues in vivo in lactating sheep. *Biochem. J.* 270, 783-786.
388. Vicini, J.L., Buonomo, F.C., Veenhuizen, J.J., Miller, M.A., Clemmons, D.R., Collier, R.J. (1991): Nutrient balance and stage of lactation affect responses of insulin, insulin-like growth factors-I and II, and insuline-like growth factor-binding protein 2 to somatotropin administration in dairy cows. *Journal of Nutrition* 121, 1656-1664.
389. Villa-Godoy, A., Hughes, T.L., Emery, R.S., Chapin, L.T., Fogwell, R.L. (1988): Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 71, 1063-1072.
390. Villar, D., Rhind, S.M., Arthur, J.R., Goddard, P.J. (2002): Manipulation of thyroid hormones in ruminants – a tool to understand their physiological role and identify their potential for increasing production efficiency. *Aust. J. Agric. Res.*, 53,259-270.
391. Villar, D., Rhind, S.M., Dicks, P., McMillen, S.R., Nicol, F., Arthur, J.R. (1998): Effect of propylthiouracil –induced hypothyroidism on thyroid hormone profiles and tissue deiodinase activity in cashmere goats. *Small Ruminant Research*, 29, 317-324.
392. Visser, T.J. (1980): Mechanism of inhibition of iodothyronine-5'-deiodinase by thiourelenes and sulfite. *Biochemica Biophysica Acta*, 611, 371-378.
393. Visser, T.J., Van Overmeeren, E., Fekkes, D., Docter, R., Hennemann, G. (1979): Inhibition of iodothyronine 5'-deiodinase by thiourelenes structure-activity relationship. *FEBS Letters*, 103, 314-318.
394. Vrzgula, L., Sokol, J. (1987): Hodnoty metabolických profilových testov u domácich zvierat a ich interpretacia, Bratislava.
395. Wallace, T.M., Levy, J.C., Matthews, D.R. (2004): Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care*, 27(6):1487-1495.
396. Wathes, D.C., Bourne, N., Cheng, Z., Mann, G.E., Taylor, V.J., Coffey, M.P. (2007): Multiple Correlation Analyses of Metabolic and Endocrine Profiles with Fertility in Primiparous and Multiparous Cows. *J. Dairy Sci.*, 90, 1310-1325.



397. Weibel, E.R. (1979). *Stereological Methods. 1. Practical Methods for Biological Morphometry*. Academic Press. London.
398. Weinstein, I., Soler-Argilago, C., Heimberg, M. (1977): Effects of oestrogen estradiol on incorporation of (<sup>14</sup>C)oleate into triglyceride and ketone bodies by the liver. *Bioch. Pharmacol.* 26,77-80.
399. Weitzel, J.M., Iwen, K.A., Seitz, H.J. (2003): Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Exp. Physiol.*, 88(1):121-128.
400. Wichtel, J.J., Craigie, A. L., Freeman, D. A., Varela-Alvarez, H., Williamson, N. B. (1996): Effect of selenium and Iodine supplementation on growth rate and on thyroid function in dairy calves at pasture. *J. Dairy Sci.*, 79, 1865-1872.
401. Williams, E.L., Rodriguez, S.M., Beitz, D.C., Donkin, S.S. (2006): Effects of Short-Term Glucagon Administration on Gluconeogenic Enzymes in the Liver of Midlactation Dairy Cows. *J. of Dairy Sci.*, 89, 2, 693-703.
402. Williams, H.L., Hill, R. (1965): The effects of feeding kale to breeding ewes. *British Veterinary Journal*, 121, 2-17.
403. Wilson, J.G. (1975): Hypothyroidism in ruminants with special reference to fetal goitre. *Vet. Record*, 97, 161-164.
404. Wrutniak-Cabello, C., Casas, F., Cabello, G. (2001): Thyroid hormone action in mitochondria. *J. Mol. Endocrinol.*, 26(1):67-77.
405. Xia, C., Wang, Z., Xu, C., Zhang, H.Y. (2012): Concentrations of plasma metabolites, hormones, and mRNA abundance of adipose leptin and hormone-sensitive lipase in ketotic and nonketotic dairy cows. *J. Vet. Intern. Med.*, 26(2):415-417.
406. Yambayamba, E.S.K., Price, M.A., Foxcroft, G.R. (1996): Hormonal status, metabolic changes and resting metabolic rate in beef heifers undergoing compensatory growth. *J. Anim. Sci.* 74:57-69.
407. Yung, M.C., Vandehaar, M.J., Fogwell, R.L., Sharma, B.K. (1996): Effect of energy balance and somatotropin on insulin-like growth factor I in serum and on weight and progesterone of corpus luteum in heifers. *J. Anim. Sci.*, 74, 2239-2244.

408. Zaninovich, A.A., Boado, R., Ulloa, E., Bromage, N.R., Matty, A.J. (1982): Inhibition of thyroidal iodine release by oestrogens in euthyroid subjects, *Acta Endocrinolog.*, 99, 386-392.
409. Zapf, J., Schmid, C., Froesch, E.R. (1984): Biological and immunological properties of insulin-like growth factors (IGF) I and II. *Clin. Endocrinol. Metab.* 13, 3-30.
410. Zdelar, F. Mitin, V., Hahn, V., Kraljević, P., Alegro, A. (1986): Studies of thyroid function in fatteninf beef cattle with special reference to hypothyrosis. II: Thyroxine and triiodothyronine content in the blood serum of normal beef cattle and those with the clinical picture of hypothyrosis. *Veterinarski Arhiv*, 56, 47-66.
411. Zhu, L.H., Armentano, L.E., Bremmer, D.R., Grummer, R.R., Bertics, S.J. (2000): Plasma concentration of urea, ammonia, glutamine around calving, and the relation of hepatic triglyceride, to plasma ammonia removal and blood acid-base balance. *J. Dairy Sci.*, 83, 734-740.
412. Zulu, V. C., Sawamukai, Y., Nakada, K., Kida, K. and Moriyoshi, M. (2002a). Relationship among insulin-like growth factor-I, blood metabolites and postpartum ovarian function in dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* 64: 879-885.
413. Zulu, V.C., Nakao, T., Sawamukai, Y. (2002b): Insulin – Like Growth Factor - I as a Possible Hormonal Mediator of Nutritional Regulation of Reproduction in Cattle. *J. Vet. Med. Sci.*, 64 (8): 657-665.
414. Zurek, E., Foxcroft, G.R., Kennelly, J.J. (1995): Metabolic status and interval to first ovulation in postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 78, 1909-1920.

## BIOGRAFIJA

Dorđe B. Savić, dr veterinarske medicine, rođen je 18. oktobra 1980. godine u Banjaluci, Bosna i Hercegovina. Osnovnu i srednju poljoprivrednu školu, smjer veterinarski tehničar, završio je u Banjaluci. Na Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisao se školske 1999/2000 godine, a diplomirao 28. septembra 2005. godine, kao treći u generaciji, sa prosječnom ocjenom 9,07. Tokom studija bio je stipendista Fonda za stipendiranje talentovanih učenika i studenata "Petar Kočić". Kao student četvrte i pete godine studija, pohvaljivan je od strane Naučno-nastavnog veća Fakulteta za uspjeh postignut tokom studija. Doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2007/2008 godine i položio sve ispite predviđene planom i programom studija, sa prosječnom ocjenom 9,50.

Nakon završenih osnovnih studija, 2006. i 2007. godine radio je kao pripravnik u Veterinarsko-stočarskom centru u Banjaluci i Veterinarskoj stanici AD Banjaluka, na poslovima proizvodnje i pakovanja duboko smrznutog sjemena bikova i terenskog veterinara. Od 01. aprila 2007. godine zaposlen je kao asistent, a od 31. marta 2011. godine kao viši asistent na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Banjaluci, za uže naučne oblasti Anatomija i fiziologija životinja, Zoohigijena i uzgojne bolesti i Zdravstvena zaštita životinja. Kao autor ili koautor do sada je objavio 45 naučnih i stručnih radova u časopisima i na naučnim skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja. Aktivni je učesnik domaćih i regionalnih naučnih i stručnih skupova iz oblasti veterinarske medicine i poljoprivrede. Učestvovao je u realizaciji šest naučno-istraživačkih projekata finansiranih od strane Ministarstva nauke i tehnologije i Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srpske.

Stručni ispit za doktora veterinarske medicine položio je 2006. godine. Član je Veterinarske komore Republike Srpske i posjeduje licencu za samostalan rad. Otac je jednog djeteta, sina Nikole. Živi i radi u Banjaluci.



## Прилог 1.

### Изјава о ауторству

Потписани: Ђорђе Савић

број уписа: \_\_\_\_\_

#### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

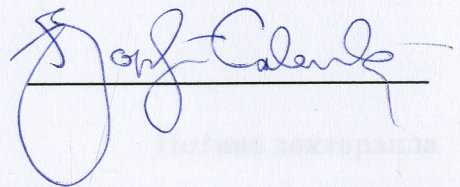
Утицај препарталне апликације пропилтиоурацила на ендокрини и метаболички статус јуница холштајн расе

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

Потпис докторанда

У Београду,

\_\_\_\_\_





## Прилог 2.

### Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Ђорђе Савић

Број уписа: \_\_\_\_\_

Студијски програм: Докторске академске студије

Наслов рада: Утицај препарталне апликације пропиолтиоурацила на ендокрини и метаболички статус јуница холштајн расе

Ментор: Проф. др Данијела Кировски

Потписани: Ђорђе Савић

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

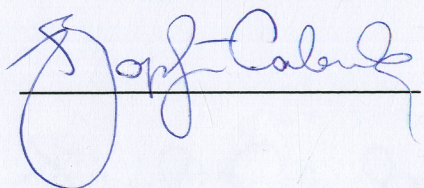
Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

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

**Потпис докторанда**

У Београду,

\_\_\_\_\_





### Прилог 3.

#### Изјава о коришћењу

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

Утицај препарталне апликације пропилтиоурацила на ендокрини и метаболички статус јуница холштајн расе

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

У Београду,

---



Потпис докторанда

A handwritten signature in blue ink, written over a horizontal line. The signature is cursive and appears to be "Jovana Cabunk".