

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ

Марија М. Пантелић

**УТИЦАЈ ПЕРОРАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ
ХРОМА НА ЕНДОКРИНИ И
МЕТАБОЛИЧКИ СТАТУС КРАВА
ХОЛШТАЈН РАСЕ**

Докторска дисертација

Београд, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Marija M. Pantelić

**EFFECT OF PERORAL CHROMIUM
ADMINISTRATION ON ENDOCRINE
AND METABOLIC STATUS OF
HOLSTEIN COWS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018.

Ментори:

Др Данијела Кировски, редовни професор

Факултет ветеринарске медицине Универзитет у Београду

Др Горан Корићанац, научни саветник

Институт за нуклеарне науке „Винча“ Универзитет у Београду

Чланови комисије:

Др Иван Вујанац, ванредни професор

Факултет ветеринарске медицине Универзитет у Београду

Др Радиша Продановић, доцент

Факултет ветеринарске медицине Универзитет у Београду

Др Сања Врањеш-Ђурић, научни саветник

Институт за нуклеарне науке „Винча“ Универзитет у Београду

Датум одбране докторске дисертације

.....

Са поштовањем и великим задовољством се захваљујем:

Својим менторима Професор др Данијели Кировски на указаном поверењу и несебичном ангажовању у свим фазама израде овог рада, од постављања огледа и давања практичних смерница током његовог извођења, преко обраде података и коначно писања дисертације. Неизмерно сам захвална на времену које ми је посветила и на корисним саветима који су омогућили успешну реализацију ове докторске дисертације.

Ментору др Горану Корићанцу захваљујем на указаном поверењу, знању и искуству које ми је пренео као и за сву људску и професионалну подршку од самог почетка израде ове докторске дисертације.

Професору др Ивану Вујанцу, доценту др Радиши Продановићу, др Љубомиру Јовановићу, др Милоју Бурићу, као и Милану Ђиђију неизмерно сам захвална на указаној помоћи у извођењу појединих задатака на фарми у оквиру ове дисертације.

Др Сањи Врађеи-Бурић захваљујем на професионалној подршци као и на стручним и корисним саветима у завршној фази израде текста овог рада.

Посебну захвалност дугујем својим колегицама др Сњежани Ромић, др Тијани Ђулафић, Јелени Станишић као и др Снежани Тепавчевић и Милану Костићу за помоћ током експерименталног дела овог рада, за њихову подршку, савете и као и за позитивну атмосферу током рада.

Захвална сам свим колегама Лабораторије за молекуларну биологију и ендокринологију Института „Винча“ који су ми на било који начин пружили помоћ и тиме допринели да ова дисертација буде боља.

Захваљујем се свом супругу Здравку на пруженом разумевању, стрпљењу и подршци током писања ове дисертације. Захваљујем се и нашој ћерки Ксенији на бескрајној радости коју ми пружа свакога дана и уз коју овај резултат има још већи значај.

На крају бих желела да изразим неизмерну захвалност на великој љубави, помоћи и подршци током целог мог школовања својим родитељима мајци Слободанки, оцу Мијодрагу и брату Александру који су увек били уз мене.

Утицај пероралне апликације хрома на ендокрини и метаболички статус крава холштајн расе

Кратак садржај

Циљ ове докторске дисертације је био да се испита утицај органског комплекса тровалентног хрома на високомлечне краве у периоду касног гравидитета и ране лактације, као и његов утицај на млечност. Тридесет дана пре очекиваног термина тељења је одабрано 20 крава холштајн расе које су подељене у две једнаке групе контролну (-Cr) и огледну (+Cr). У периоду од 25. дана пре очекиваног термина тељења до 30. дана после тељења, +Cr група крава је свакодневно перорално са јутарњим obroком добијала 10 mg, односно 5 g препарата са органски везаним хромом (0,2 % органског препарата тровалентног хрома везаног у квасцу (Co-Factor III Cr Yeast, *Alltech*).

Интравенски тест толеранције глукозе (IVGTT) је урађен на укупно 12 крава (n=6 крава по групи) четири пута током испитиваног периода и то 28. и 7. дана пре очекиваног термина тељења као и 10. и 30. дана после тељења. Крв је узимана 0., 15., 30., 60., 90., 120. минута теста за одређивање концентрација глукозе и инсулина.

Коришћењем података добијених током IVGTT урађена је и кинетика глукозе и инсулина. У узорцима крви узетим 0. минута IVGTT одређена је, поред концентрација глукозе и инсулина, концентрација NEFA (*non-esterified fatty acids*), ВНВА (*beta hydroxybutyric acid*), укупних протеина, албумина, урее, холестерола, триглицерида (TG), укупног билирубина (TB), Mg, Ca, P и кортизола, као и активности AST и GGT. У циљу испитивања инсулинске резистенције периферних ткива обрачунат је RQUICKI (*Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*) који је показатељ осетљивости ткива на инсулин. Узорци мишићног и масног ткива су узимани биопсијом четири пута у току огледног периода и то 30. и 10. дана пре очекиваног термина тељења као и 7. и 28. дана после тељења, када је урађена и

процена телесне кондиције (*BCS-body condition score*). Узорци ткива јетре су узимани два пута током огледног периода и то 10 дана пре очекиваног термина тељења као и 7. дана после тељења у циљу одређивања протеинске експресије молекула инсулинског сигналног пута. Млечност је праћена током првих 14 недеља лактације. Састав млека је одређиван 7. и 28. дана лактације.

Гликемија је код +Cr била статистички значајно нижа ($p < 0,05$) него код –Cr само 10. дана после тељења, док је концентрација албумина била статистички значајно нижа код +Cr 30 дана после тељења ($p < 0,05$). Концентрација TG је била значајно виша ($p < 0,05$), 10. дана после тељења док је 30. дана била значајно нижа ($p < 0,05$) у +Cr у односу на –Cr. Код +Cr у поређењу са –Cr, активности AST су биле значајно ниже ($p < 0,05$) 10 дана после тељења, док су активности GGT значајно ниже ($p < 0,05$) 30 дана после тељења. Концентрације кортизола су биле статистички значајно ниже код +Cr 7 дана пре очекиваног термина тељења као и 30 дана после тељења ($p < 0,001$ и $p < 0,05$, појединачно). Концентрације ВНВА, протеина, урее, холестерола, ТВ, Mg, Са и Р се нису статистички значајно разликовале између група током испитиваног периода.

Хром је имао супротан ефекат на кинетику инсулина током IVGTT изведеним пре очекиваног термина тељења у односу на период након тељења. Седам дана пре очекиваног термина тељења INS_{peak} , ΔMAX_{ins} , AUC_{ins} су били значајно нижи ($p < 0,05$) у +Cr у поређењу са –Cr групом, док су 10. дана после тељења сви параметри кинетике инсулина били значајно виши ($p < 0,05$) у +Cr групи у поређењу са –Cr, док су 10. дана после тељења сви параметри кинетике инсулина били значајно виши ($p < 0,05$) у +Cr у поређењу са –Cr групом. Концентрације NEFA су биле значајно ниже ($p < 0,05$) 7 дана пре очекиваног термина тељења и 30. дана после тељења у +Cr групи, док су 10. дана после тељења биле статистички значајно више ($p < 0,05$) у +Cr групи у поређењу са –Cr.

Десет дана пре очекиваног термина тељења, садржај протеина инсулинског рецептора ($IR\beta$) био је статистички значајно већи ($p < 0,05$) у мишићном ткиву, а фосфорилација IRS-1 на серину 307 ($pIRS-1 Ser^{307}$) била је значајно нижа ($p < 0,05$) у јетри +Cr групе. После тељења, $pIRS-1 Ser^{307}$ био је значајно нижи у мишићном

ткиву 7. и 28. дана ($p < 0,05$ и $p < 0,001$, појединачно), док је фосфорилација АКТ на серину 473 (pAKT Ser⁴⁷³) била виша ($p < 0,01$) у ткиву јетре 7 дана пре очекиваног термина телјења код +Cr групе.

Код +Cr, млечност је била статистички значајно нижа у 2., 4., 5., 12., 13. и 14. недељи лактације ($p < 0,01$, појединачно) као и током 1., 3., 8., 9. и 10. недеље лактације ($p < 0,05$). Енергетски коригована млечност (*ECM energy-corrected milk*) је била нижа ($p < 0,05$) у +Cr групи 7. дана лактације. Унос суве материје (*DMI-dry matter intake*) и BCS били су значајно виши ($p < 0,05$) у +Cr групи 7 дана пре очекиваног термина телјења у поређењу са –Cr.

Закључујемо да хром утиче на инсулински сигнални пут код +Cr крава, али да су циљни молекули различити у пре и постпарталном периоду. Та разлика вероватно потиче од различите дужине трајања изложености хрому и различитих енергетских статуса крава. Додатно, хром је смањио липомобилизацију у периоду пре телјења јер је стимулисао унос хране, али је негативно утицао на млечност крава, вероватно као последица повећане секреције инсулина постпартално.

Узимајући у обзир да је главни циљ говедарске производње модулација метаболизма у правцу повећања млечности, наши резултати указују да додавање хрома у храну није добар избор за високомлечне краве које се гаје у фармским условима, с обзиром на то да хром преусмерава метаболизам глукозе на начин који доводи до смањења количине произведеног млека.

Кључне речи: крава, хром, инсулински сигнални пут

Научна област: Ветеринарска медицина

Ужа научна област: Физиологија

UDK број: 591.147:636.234:546.76

Effect of peroral chromium administration on endocrine and metabolic status of Holstein cows

SUMMARY

The objective of this study was to investigate the effects of peroral chromium administration on the on high-yielding cows metabolism during the period of late gestation and early lactation, as well as its impact on milk yield. Thirty days before the expected time of parturition, 20 Holstein cows were chosen and divided into two equal groups: control (-Cr) and experimental (+Cr). From day 25 before expected time of parturition up to day 30 after parturition, +Cr received 10 mg of Cr or 5 g per day in the form of chromium-enriched yeast (0.2 % Cr³⁺ Co-factor III chromium yeast, *Alltech*).

Intravenous glucose tolerance test (IVGTT) was performed on a 12 cows (n = 6 cows per group) four times during the examined period, on days 28th and 7th before the expected time of parturition, as well as on the 10th and 30th day after calving. The blood was taken at 0., 15., 30., 60., 90., 120. minutes of the test to determine the glucose and insulin levels.

Using the data obtained during IVGTT, kinetics of glucose and insulin were also performed. The concentrations of non-esterified fatty acids (NEFA), BHBA (*beta hydroxybutyric acid*), total proteins, albumin, urea, cholesterol, triglycerides (TG), total bilirubin (TB), Mg, Ca, P and cortisol, as well as activities of AST and GGT were measured in blood samples taken at minute 0. of IVGTT. In order to examine the peripheral tissue insulin resistance, RQUICKI (*Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*) was calculated. Muscle and adipose tissue samples were taken by biopsy four times during the trial period, 30 and 10 days before the expected time of parturition as well as on the day 7th and 28th day after calving, in time when the body condition score (BCS) was also determined. Hepatic tissue samples were taken twice during the trial period, 10 days before expected time of parturition, and 7 days after calving in order to determine the protein expression of the insulin signal pathway molecules. Milk yield was

recorded during the first 14 weeks of lactation. The milk composition was determined on the 7th and 28th day of lactation.

Glycemia at +Cr was significantly lower ($p < 0.05$) than in -Cr only 10 days after calving, while the albumin concentration was significantly lower ($p < 0.05$) at +Cr 30 days after calving. The TG concentration was significantly higher ($p < 0.05$) 10 days after calving, while on the 30th day it was significantly lower ($p < 0.05$) in +Cr compared to -Cr. In +Cr, compared to -Cr AST activities were significantly lower ($p < 0.05$) 10 days after calving, while GGT activity was significantly lower ($p < 0.05$) 30 days after calving. Cortisol concentrations were significantly lower at +Cr 7 days before the expected time of parturition as well as 30 days after calving ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively). Concentrations of BHBA, protein, urea, cholesterol, TB, Mg, Ca, and P did not statistically significantly differ between groups during examined period.

Chromium had the opposite effect on the insulin kinetics during the IVGTT carried out before expected time of parturition in relation to the period after calving. Seven days before the expected time of parturition INS_{peak} , ΔMAX_{ins} , AUC_{ins} were significantly lower ($p < 0.05$, respectively) in +Cr compared to the -Cr group, while on the day 10 after calving all the parameters of the insulin kinetics were significantly higher ($p < 0.05$, respectively) in the +Cr group compared to -Cr. NEFA concentrations were significantly lower ($p < 0.05$) 7 days before expected time of parturition and 30 days after calving in the +Cr group, while on the 10th were significantly higher ($p < 0.05$) in +Cr group compared with -Cr.

Ten days before expected time of parturition, the content of the protein insulin receptor ($IR\beta$) was significantly higher ($p < 0.05$) in muscle tissue, and the phosphorylation of the insulin receptor substrate 1 at serine 307 ($pIRS-1 Ser^{307}$) was significantly lower ($p < 0.05$) in the liver +Cr group. After calving, $pIRS-1 Ser^{307}$ was significantly lower in muscle tissue 7 and 28 days ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively), while phosphorylation of AKT at serine 473 ($pAKT Ser^{473}$) was higher ($p < 0.01$) in the hepatic tissue 7 days before the expected time of parturition at +Cr.

In +Cr, milk yield was significantly lower on weeks 2, 4, 5, 12, 13, 14 of lactation ($p < 0.01$, respectively), as well as during 1, 3, 8, 9, 10 weeks of lactation ($p < 0.05$,

respectively). Energy-corrected milk (ECM) were lower ($p < 0.05$) in the +Cr group 7 days of lactation. The dry matter intake (DMI) and BCS were significantly higher ($p < 0.05$) in the +Cr group 7 days before expected time of parturition compared to -Cr.

We conclude that chromium affects the insulin signaling pathway in the +Cr cows, but that the target molecules are different in the pre and postpartum period. This difference probably arises from the different length of exposure to chromium and various energy status of cows. Additionally, chromium reduced lipomobilization in the period before calving because it stimulated the intake of food, but had a negative effect on the milk yield of the cows, probably as a consequence of increased insulin secretion postpartum.

Considering that the main goal of cattle production is the modulation of metabolism towards increasing milk yield, our results indicate that the peroral supplementation of chromium is not a good choice for high-yielding cows, since chromium redirects glucose metabolism in a way that reduce the amount of produced milk.

Key words: bovine, chromium, insulin signaling pathway

Scientific area: Veterinary medicine

Specific scientific field: Physiology

UDK number: 591.147:636.234:546.76

Садржај

1. УВОД	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	4
2.1. Хормонално- метаболички статус крва у перипарталном периоду	4
2.1.1. Значај активности инсулинске осовине у перипарталном периоду	7
2.1.1.1. Улога инсулина у метаболизму угљених хидрата	8
2.1.1.2. Улога инсулина у метаболизму масти	9
2.1.1.3. Улога инсулина у метаболизму протеина	10
2.1.2. Инсулинска резистенција у перипарталном периоду	11
2.1.3. Липомобилизација у условима NEB	12
2.1.4. Глуконеогенеза у условима NEB	14
2.2. Синтеза, секреција и структура и сигнални пут инсулина	16
2.2.1. Рецептор за инсулин (IR)	17
2.2.2. Супстрати инсулинског рецептора (IRS)	19
2.2.3. Протеин киназа Б (АКТ)	21
2.2.4. GLUT	21
2.2.5. Метаболички пут након активације рецептора за инсулин	23
2.3. Хром	25
2.3.1. Ресорпција хрома и биорасположивост	27
2.3.2. Депоновање хрома у организму	29
2.3.3. Екскреција хрома	30
2.3.4. Утицај хрома на сигнални пут инсулина	30
2.3.4.1. Улога хрома у активацији IR	32
2.3.4.2. Утицај хрома на IRS-1, АКТ и PI3K	32
2.3.4.3. Улога хрома у активацији транслокације транспортног протеина за глукозу (GLUT4)	33
2.3.5. Утицај хрома на модулирање метаболичких путева код крва	34
3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ ИСТРАЖИВАЊА	37
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА	39

4.1. Место истраживања	39
4.2. Огледне животиње и њихов третман	39
4.3. Методе рада	41
4.3.1. Узимање узорака крви	41
4.3.2. Интравенски тестови оптерећења глукозом (IVGTT)	41
4.3.3. Узимање узорака ткива јетре	42
4.3.4. Узимање узорака мишићног и масног ткива	43
4.3.5. Одређивање концентрације биохемијских параметара крви	44
4.3.6. Одређивање концентрације хормона.....	45
4.3.6.1. Одређивање концентрације инсулина	45
4.3.6.2. Одређивање концентрације кортизола у узорку.....	46
4.3.7. Припрема ћелијског лизата мишићног и масног ткива и јетре.....	47
4.4. Одређивање концентрације протеина у лизату ВСА методом.....	48
4.5. Електрофореза на SDS полиакриламидном гелу (SDS-PAGE)	48
4.5.1. Western blot	49
4.6. Математички израчунати показатељи инсулинске резистенције	51
4.7. Млечност и анализе састава млека.....	52
4.8. Оцена телесне кондиције	52
4.9. Статистичке анализе	53
5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА	54
5.1. Заступљеност протеина инсулинског сигналног пута у мишићном ткиву ..	54
5.1.1. Заступљеност протеина IR β у мишићном ткиву	54
5.1.2. Заступљеност протеина pIRS-1Ser ³⁰⁷ у мишићном ткиву.....	56
5.1.3. Заступљеност протеина pAKT Ser ⁴⁷³ у мишићном ткиву.....	57
5.1.4. Заступљеност протеина GLUT4 у мишићном ткиву.....	59
5.2. Заступљеност протеина инсулинског сигналног пута у субкутаном масном ткиву	60
5.2.1. Заступљеност протеина IR β у субкутаном масном ткиву	60
5.2.2. Заступљеност протеина pIRS-1Ser ³⁰⁷ у субкутаном масном ткиву.....	62
5.2.3. Заступљеност протеина pAKT Ser ⁴⁷³ у субкутаном масном ткиву	63

5.2.4. Заступљеност протеина GLUT4 у субкутаном масном ткиву	65
5.3. Заступљеност протеина инсулинског сигналног пута у ткиву јетре	66
5.3.1. Заступљеност протеина IRβ у јетри.....	66
5.3.2. Заступљеност протеина pIRS-1 Ser ³⁰⁷ у јетри	68
5.3.3. Заступљеност протеина pAKTSer ⁴⁷³ у јетри	69
5.4. IVGTT.....	71
5.4.1. IVGTT изведен 28 дана пре очекиваног термина тељења.....	71
5.4.2. IVGTT изведен 7 дана пре очекиваног термина тељења.....	72
5.4.3. IVGTT изведен 10 дана после тељења	73
5.4.4. IVGTT изведен 30 дана после тељења	74
5.5. Математички изведени параметри динамике промена концентрација глукозе и инсулина током IVGTT	75
5.5.1. Параметри тренда промене концентрације глукозе.....	75
5.5.2. Параметри тренда промене концентрације инсулина.....	76
5.6. Математички израчунати показатељи инсулинске сензитивности.....	77
5.7. Биохемијски параметри крви.....	78
5.7.1. Показатељи енергетског статуса.....	79
5.7.1.1. Глукоза.....	79
5.7.1.2. NEFA.....	80
5.7.1.3. ВНВА	81
5.7.2. Показатељи протеинског статуса.....	82
5.7.2.1. Укупни протеини	82
5.7.2.2. Албумин.....	83
5.7.2.3. Уреа.....	84
5.7.4. Показатељи липидног статуса.....	85
5.7.4.1. Холестерол	85
5.7.4.2. TG	86
5.7.5. Показатељи функционалног стања јетре	87
5.7.5.1. ТВ	87
5.7.5.2. АСТ	88

5.7.5.3. GGT	89
5.7.6. Показатељи минералног статуса.....	90
5.7.6.1. Mg.....	90
5.7.6.2. Ca.....	91
5.7.6.3. P	92
5.8. Хормони енергетског метаболизма.....	93
5.8.1. Инсулин.....	93
5.8.2. Кортизол.....	94
5.9. Млечност и састав млека.....	95
5.10. Унос суве материје и оцена телесне кондиције	97
6. ДИСКУСИЈА.....	98
6.1. Сигнални пут инсулина	98
6.2. IVGTT.....	101
6.3. Биохемијски параметри крви.....	104
6.3.1. Показатељи енергетског статуса.....	104
6.3.1.1. Глукоза.....	104
6.3.1.2. NEFA.....	105
6.3.1.3. ВНВА	107
6.3.2. Показатељи протеинског статуса.....	108
6.3.2.1. Укупни протеини	108
6.3.2.2. Албумин.....	108
6.3.2.3. Уреа.....	109
6.3.3. Показатељи липидног статуса.....	109
6.3.3.1. Холестерол и TG.....	110
6.3.4. Показатељи функционалог стања јетре.....	111
6.3.4.1. ТВ	111
6.3.4.2. AST.....	111
6.3.4.3. GGT	112
6.3.5. Показатељи минералног стауса	112
6.4. Хормонални статус	113

6.4.1. Инсулин.....	113
6.4.2. Кортизол.....	113
6.5. Млечност и хемијски састав млека	114
7. ЗАКЉУЧЦИ.....	116
8. ЛИТЕРАТУРА	118

1. УВОД

Циљ млекарске индустрије је производња квалитетног млека за широку потрошњу. У многим земљама је просечан принос млека по крави у последњих пола века више него удвостручен. До средине осамдесетих година прошлог века раст производње млека је био последица примене бољих стандарда у исхрани, а који су се односили на коришћење квалитетнијих намирница у исхрани животиња и повећане искористљивости различитих компонената сточне хране, укључујући и минералне материје. Препоруке у исхрани фармских животиња биле су углавном везане за процену минималног садржаја хранљивих материја у оброку и његову енергетску вредност, а у односу на врсту и интензитет производње.

Последње две деценије прошлог века, пораст производње млека по крави је додатно остварен интензивнијим коришћењем вештачке инсеминације крава са семеном прогено тестираних бикова чије су мајке имале генетску предиспозицију за високу производњу млека. Међутим, та генетска селекција на високу продуктивност крава имала је одређене последице које су се негативно одразиле на здравље и добробит саме животиње. Наиме, са почетком лактације јављају се додатне потребе у хранљивим материјама за производњу млека које, уз истовремени смањени унос суве материје, доводе до појачане мобилизације хранљивих материја (масти и протеина) из телесних резерви у циљу очувања лактације. Повишене вредности NEFA и кетонских тела у крви, услед интензивне липолизе, доводе до повећања учесталости метаболичких поремећаја (масне јетре, левостане дислокације сиришта, кетозе) као и репродуктивних обољења (цисте на јајницима и маститис) које се последично негативно одражавају на плодност крава. Метаболички поремећаји и репродуктивна обољења представљају чест разлог искључивања животиња из производње као и скраћења њиховог животног века.

Истраживања физиолошких механизма (ендокриног и метаболичког статуса) високомлечних крава у периоду засушења и припреме за наредну лактацију је од великог значаја с обзиром на то да се значајне промене у хормонском статусу

животиња дешавају управо током овог производно-репродуктивног циклуса крава. Током гравидитета и ране лактације сви сисари, укључујући и краве, развијају одређени степен инсулинске резистенције са циљем да хранљиве материје и глукоза из оброка директно одлазе у плаценту за пораст плода током гравидитета, а након тељења у млечну жлезду за потребе успостављања и одржавања лактације. Постељица и млечна жлезда представљају инсулин независне зоне и нису у директној конкуренцији са другим ткивима у смислу употребе глукозе. Инсулинска резистенција која се јавља у перипарталном периоду је корисна и неопходна за плод и његов опстанак у животу и за боље напредовање након рођења, док се по саму мајку ово стање може неповољно одразити с обзиром на то да недостатак хранљивих материја и глукозе представља један од фактора ризика за настанак метаболичких и репродуктивних обољења након тељења.

Истраживања ендокриног и метаболичког статуса крава у перипарталном периоду добијају посебан значај током последње деценије са интензивирањем развоја техника у молекуларној биологији, јер се коришћењем ових техника омогућавају различите манипулације метаболизма које за последицу имају повећање млечности уз очување здравља животиња.

Данас се уводе различити додаци храни, укључујући и минералне материје, у циљу побољшања здравља и продуктивности крава које се гаје у фармским условима, а нарочиту примену проналазе током перипарталног периода када се сматра да су јединке најугроженије. Минералне материје су неопходне за правилно и несметано одвијање метаболичких процеса у организму (раст, производњу и репродукцију), па је и остваривање високог генетског потенцијала високомлечних крава у директној вези са одговарајућим снабдевањем минералима.

Један од микроелемената предложен као додатак у храни крава је хром из органских извора, за који је показано да утиче на стање инсулинске резистенције. Наиме, хром поспешује активност инсулина повећањем броја (IR) на мембрани ћелије, доводећи до мобилизације инсулин зависних глукоза транспортера 4 (GLUT4) (*glucose transporter*) на површини инсулин сензитивних ћелија чиме повећава допремање глукозе у ткива. Значај хрома као есенцијалног микроелемента најпре је утврђен код

лабораторијских животиња, пре свега код мишева и пацова, педесетих година прошлог века, а онда и код људи оболелих од типа 2 шећерне болести (*Diabetes mellitus type II*) код којих је утврђен добар одговор након коришћења хрома.

Досадашњи литературни подаци о утицају хрома код фармских животиња су базирани на подацима који се односе на праћење ендокриних и метаболичких параметара као и приноса млека, без објашњења молекуларних механизма настанка тих промена.

У циљу бољег разумевања и доношења свеобухватних закључака о утицају хрома на инсулински сигнални пут, чији су молекуларни механизми детаљно објашњени код лабораторијских глодара којима је изазван дијабетес као и код људи оболелих од дијабетеса, одлучили смо да испитамо утицај хрома на инсулински сигнални пут код високомлечних крава. Сматрали смо да постоји научна оправданост за спровођењем те врсте истраживања с обзиром на то да још увек нису урађена на преживарима. Тачни механизми којима хром утиче на инсулински сигнални пут још увек нису прецизно дефинисани. Добијени подаци би допринели појашњавању улоге хрома, на метаболизам високомлечних крава током перипарталног периода када је животиња изложена највећем стресу, како нутритивном тако и метаболичком.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Хормонално- метаболички статус крава у перипарталном периоду

Интензивна селекција крава је током низа претходних деценија била усмерена на побољшавање оних особина јединке чија би последица била повећање економске исплативости производње. Тако је код високомлечних категорија животиња селекција била превасходно усмерена на такво престојавање метаболизма које је довело до преусмеравања енергетских прекурсора ресорбованих из дигестивног тракта ка млечној жлезди уместо ка масном ткиву (Agnew и Yan, 2000, Yan и сар., 2006). Синтеза млека је постала примарни физиолошки процес доводећи до повећања млечности код селекционисаних крава (Olteneacu и Broom, 2010). Високомлечне краве обично производе преко 50 литара млека дневно у врхунцу лактације. О каквом се метаболичком оптерећењу ради најбоље илуструје податак да би еквивалент такве производње код жена била дневна производња млека од 8 литара (Bell и Bauman, 1994).

Међутим, једнострана селекција код крава је истовремено повећала ризик од настанка различитих метаболичких поремећаја у случајевима када унос хране није био усклађен са новонасталим променама у метаболизму и ендокрином систему које подржавају високу производњу млека. Истраживања Pрусе и Veerkamp (2001) указују да је једнострана селекција на високу производњу млека често повезана са поремећајима здравља, али и са поремећајима репродукције и добробити животиња. Последице ових обољења имају хронични карактер и често се испољавају и током наредне лактације и представљају један од главних узрока економских губитака на фарми.

Перипартални или транзициони период код крава обухвата период од три недеље пре до три недеље после тељења (Grummer, 1995). Тај период је посебно издвојен јер се у њему одвијају најзначајније промене у метаболизму, због преласка краве мајке из стања гравидитета, када је метаболизам углавном оријентисан на омогућавање завршног развоја плода, у стање лактације, праћено интензивном активношћу млечне жлезде.

Током гравидитета метаболизам женки сисара је подложен променама подређеним расту и развоју плода. Ендокрино и метаболичко прилагођавање мајке потребама плода зависи од стадијума гравидитета, а најизраженије је током последњег триместра када долази до значајног повећања масе плода (Ladyman и сар., 2010, Vejrazkova и сар., 2014), али и до припреме млечне жлезде за почетак лактације. Хормони који регулишу развиће и раст плода током гравидитета доводе до метаболичких промена у организму мајке које повећавају доступност хранљивих материја плоду.

Рана и средња фаза гравидитета је удружена са депоновањем масног ткива у телу мајке (Faulkner, 1983), док је касна фаза код бројних врста женки сисара, укључујући и жене, удружена са инсулинском резистенцијом (Connolly и сар., 2007). Код непреживара је инсулинска резистенција ткива ограничена само на период касног гравидитета, јер се са почетком лучења млека секреција инсулина и одговор мишићног и масног ткива на инсулин нормализују (Ramos-Román 2011). Код крава, оваца и коза, инсулинска резистенција ткива се продужава и током периода ране лактације јер је неопходно да се лактација одвија неометано у условима физиолошки ниских концентрација глукозе у циркулацији (Giesy и сар., 2012, Bauman, 2000). Nayirili (2006) је утврдио да су за измењен одговор масног ткива на инсулин код крава одговорна изразита варирања у концентрацијама појединих хормона (прогестерона, пролактина и естрогена) која се дешавају у последњој фази гравидитета. Наиме, за завршетак гравидитета је карактеристична смена концентрација различитих хормона присутних у циркулацији мајке. Концентрације прогестерона се одржавају на високом нивоу током целокупног периода гравидитета, а њихов нагли пад се дешава у просеку два дана пре тељења (Chew и сар., 1979). Концентрације 17 β -естрадиола у циркулацији се постепено повећавају у последњој трећини гравидитета, досежући максималне вредности од једне до две недеље пре тељења (Bell, 1995). Након тога, посебно на дан тељења, вредности 17 β -естрадиола значајно падају (Chew и сар., 1979).

Истраживања изведена на људима су показала да су за развој инсулинске резистенције у касном гравидитету одговорни хумани плацентрани лактоген и естроген (Boden, 1996). Плацентарни лактогени су утврђени и у ткивима преживара и

то крава (Blank и сар., 1977), оваца (Noel и сар., 2003) и коза (Currie и сар., 1977), али до сада није испитана његова улога у развоју инсулинске резистенције.

Током последње три недеље гравидитета код крава долази до губитка апетита чак и до 30 % у односу на апетит током ране фазе гравидитета, што представља својеврстан проблем јер плод и постељица имају највеће потребе у енергији управо током периода касног гравидитета (Bell, 1995). Овакав губитак апетита у периоду пре порођаја забележен је и код осталих женки сисара (Friggens, 2003). У литератури се наводе два различита тумачења настанка ове појаве. Први је да високе концентрације 17 β -естрадиола у циркулацији имају неповољан утицај на апетит што за последицу има смањен унос суве материје оброка код крава (Grummer, 1993, Forbes, 1986). Друго тумачење, које предлажу Allen и сарадници (2005), је да повећане концентрације NEFA и ВНВА настале као последица липолизе током инсулинске резистенције у касној фази гравидитета, доводе до губитка апетита и смањене конзумације хране.

Период почетка лактације, након тељења, представља енергетски најзахтевнији период током читавог производно-репродуктивног циклуса код крава, с обзиром на то да тада долази до интензивног прилагођавања ендокриног система и метаболизма на високу производњу млека.

Хомеореза подразумева промене у метаболизму које пружају подршку физиолошки повећаним захтевима за глукозом током периода краја гравидитета и почетка лактације (Bauman и Currie, 1980). Са отпочињањем лактације потребе у хранљивим материјама, односно глукози, аминок и масним киселинама, се значајно повећавају и појединачно су веће за 2,7; 2,0 и 4,5 пута у односу на период засушења (Bell, 1995). Те потребе је неопходно задовољити у временском периоду од једне до две недеље након тељења. Губитак апетита током овог периода (Grummer и сар., 2004, Allen и сар., 2005) представља изразито неповољан фактор за задовољавање повећаних потреба у хранљивим материјама. У условима гладовања, животиње се налазе у стању NEB (*Negative energy balance*- негативни енергетски биланс) и принуђене су да мобилишу сопствене телесне резерве (претежно из депоа масног ткива) у циљу надокнађивања недостатка у енергији. NEB се огледа у смањењу концентрација

глукозе, инсулина и IGF-I (*Insulin like growth factor I*) у циркулацији и у повећању концентрација NEFA и хормона раста (Drackley, 1999).

Један од облика физиолошког прилагођавања на NEB, који настаје између 2. и 12. дана лактације и траје до 70. дана лактације (Drackley, 1999), је преусмеравање метаболизма у правцу катаболичких процеса.

2.1.1. Значај активности инсулинске осовине у перипарталном периоду

За рану фазу лактације је карактеристично да негативна повратна спрега, која би у условима смањеног уноса хране довела до смањења млечности, није активна. То је значајно јер је тако омогућено преусмеравање метаболизма ка производњи млека на рачун телесних резерви, а што се не дешава током средње фазе лактације када је механизам негативне повратне спреге поново функционалан. Наиме, у истраживањима Gross и сарадника (2011) је запажено да се током ране лактације млечност крава одржава упркос NEB, а када се у каснијим фазама лактације проузрокује NEB (кроз ограничавање количине хране) недовољан енергетски унос се одмах одражава на смањење количине синтетисаног млека.

Да би млечна жлезда одржала активност у неповољним околностима, неопходно је метаболичко прилагођавање у коме посебан значај има инсулин. Наиме, одговор инсулина на глукозу, али и одговор ткива на инсулин се разликује током различитих производно-репродуктивних фаза, а улога инсулина је да подржи постојеће физиолошко стање и да преусмери хранљиве материје према физиолошки задатим приоритетима. Током перипарталног периода концентрације инсулина се одржавају на ниском нивоу (Bell, 1995, Herzog, 2001, Holtenius и Holtenius 2007), а касније у зависности од стадијума лактације и концентрације инсулина се разликују (Herbein и сар., 1985). Наиме, у периоду од 2. до 4. недеље после тељења када је млечност на свом врхунцу, концентрације инсулина су најниже. Повећање његове концентрације се дешава постепено и удружено је са смањењем количине синтетисаног млека што се дешава током периода средине лактације (Smith, 1974).

Gutierrez и сарадници (2006) су доказали да краве селекционисане на високу млечност имају ниже концентрације инсулина у поређењу са аутохтоним и неселекционисаним кравама. Код људи је такође потврђена генетска предодређеност у секрецији и одговору ткива на инсулин (Gerich, 1998), а литературни подаци указују да је интензивна селекција крава на високу млечност посредована променама у секрецији инсулина и одговору периферних ткива на инсулин, али и променама у другим хормонима неопходним за метаболизам (хормону раста, IGF, лептину) (Garnsworthy, 2008).

Инсулин, поред своје улоге у прерасподели хранљивих материја у организму мајке, има важну улогу и у синтези појединих састојака млека (Brockman и Laarveld, 1986). Млечна жлезда има изразите потребе за глукозом, при чему она користи 85 % доступне глукозе из крви (Zhao и сар., 1996, Beever и сар., 1998) и 97 % енергије добијене из унете хране (Drackley, 1999). Масне киселине синтетисане у млеку крава воде порекло из два извора. Први су масне киселине из крви, а други је последица *de novo* синтезе масти у епителним ћелијама млечне жлезде (Chilliard и сар., 2000). Према истраживањима (Bell, 1995) NEFA из циркулације у првим данима лактације учествује у синтези чак 40 % млечне масти.

2.1.1.1. Улога инсулина у метаболизму угљених хидрата

Основна улога инсулина у организму је очување енергије. Своју анаболичку активност инсулин остварује у јетри, мишићима и масном ткиву, а његов утицај на метаболизам глукозе је различит у зависности од ткива.

Инсулин у мишићима активира ензим глукокиназу која катализује реакцију претварања глукозе у глукозо-6-фосфат. У мишићном ткиву глукоза се може оксидовати и служити као извор енергије за мишићни рад или се депоновати у форми гликогена повећањем активности ензима гликоген синтазе. Разградња гликогена се код свих животиња дешава посредством глюкагона и адреналина који утичу на

активност гликоген фосфорилазе. У хепатоцитима преживара и непреживара инсулин стимулише стварање гликогена. Код непреживара глукокиназа има главну улогу у полимеризацији глукозе (Brockman, 1984), док код преживара због ниске активности овог ензима у јетри (Brockman и Laarveld, 1986) синтеза гликогена се одвија под утицајем хексокиназе (Brockman, 1984). Инсулин онемогућава да се створи већа количина глукозе тиме што блокира активност неколико кључних ензима глуконеогенезе: фруктоза бифосфатазе, пируват карбоксилазе и фосфоенолпируват карбоксикиназе (O'Brien и Granner, 1990, Hayirili, 2006).

Осим овога, инсулин контролише и активност гликолитичких ензима фосфофруктокиназе и пируват киназе (Verne и Levy, 1993). Главни корисник глукозе је скелетно мишићно ткиво обзиром да је између 60 и 70 % уласка глукозе посредовано овим хормоном (Smith, 2002). Масно ткиво преживара користи изразито мале количине глукозе (око 1 %) из циркулације, док млечна жлезда на почетку лактације може свакодневно и до 3 kg глукозе да искористи за производњу лактозе млека.

2.1.1.2. Улога инсулина у метаболизму масти

У масном ткиву, јетри и млечној жлезди животиња у лактацији инсулин стимулише синтезу масних киселина (Wilcox, 2005). Ballard и Hanson су 1967. године утврдили да због ниских активности појединих ензима (цитрат лијазе и малат дехидрогеназе) у масном ткиву преживара глукоза представља слаб извор дуголанчаних масних киселина, па код преживара, ацетат који је настао микробијалном ферментацијом у бурагу представља главни енергетски супстрат за *de novo* синтезу масних киселина (Nafikov и Beitz, 2007), али и за депоновање вишка енергије код преживара, за разлику од непреживара код којих је глукоза главни извор за синтезу TG (Hanson и Ballard, 1967).

Наиме, након активације ацетата у ацетил-СоА он се директно користи у синтези масти или подлеже оксидацији у Кребсовом циклусу (Denton и Tavare, 1997).

Масно ткиво преживара представља главно место синтезе масних киселина за разлику од непреживара код којих је јетра примарни орган липогенезе (Ingle и сар.,

1972). NEFA представља главни прекурсор за депоновање масти у јетри крава, оваца и коза (Emery и сар., 1992). Вишак глукозе се након попуњавања резерви гликогена, катаболише до ацетил-СоА који је прекурсор за синтезу масних киселина, што је корисно по сам животињу јер је на тај начин онемогућено стварање кетонских тела (Brockman, 1978, 1979) и развој кетозе. У масном ткиву инсулин стимулише улазак глукозе и синтезу масних киселина појачаном фосфорилацијом ацетил СоА карбоксилазе, а оксидација масти је онемогућена инхибицијом карнитин ацил трансферазе. Дефосфорилацијом ензима хормон сензитивне липазе инсулин онемогућава да се TG ослободе из телесних резерви.

2.1.1.3 Улога инсулина у метаболизму протеина

У организму не постоји класична резерва протеина као што је то случај са мастима које су депоноване у масном ткиву, па у условима повећаних захтева у енергији за несметано одвијање животних процеса протеини подлежу процесима разградње. Супротна ситуација, односно синтеза протеина, се дешава током периода појачаног калоријског уноса под утицајем повишених концентрација инсулина. Високе концентрације инсулина подстичу синтезу протеина и онемогућавају њихову разградњу инхибицијом процеса глуконеогенезе (Saltiel и Kahn, 2001). Своју улогу у синтези протеина инсулин остварује на тај начин што најпре стимулише улазак одређених аминокиселина (леуцина, изолеуцина, валина, тирозина и фенилаланина) у ћелије (Brockman и сар., 1975), а затим подстиче транскрипцију специфичне iRNK (информационе рибонуклеинске киселине) и њено превођење у протеине у рибозомима чиме доприноси повећању количине синтетисаних протеина. Ова особина инсулина је слична хормону раста с обзиром на то да стимулацијом синтезе протеина инсулин има утицај на раст.

2.1.2. Инсулинска резистенција у перипарталном периоду

Ниске концентрације инсулина у крви током перипарталног периода условљавају појачану липолизу, протеолизу и глуконеогенезу (Cunningham и Klein, 2007) чиме се обезбеђују хранљиве материје у условима инсулинске резистенције.

У литератури се појављује више дефиниција инсулинске резистенције. Тако Kahn (1978) је инсулинску резистенцију дефинисао као стање слабијег одговора ткива на инсулин. Две деценије касније (1998) Hunter и Garvey дају сличну дефиницију инсулинске резистенције описујући је као смањену способност инсулина да при физиолошким концентрацијама у циркулацији стимулише улазак глукозе у инсулин сензитивна ткива. Nayirli (2006) даје ширу дефиницију по којој је инсулинска резистенција стање које повезује недостатак инсулина, његово смањено стварање под утицајем глукозе као и смањен ефекат инсулина на мишићно и масно ткиво у смислу употребе глукозе. Све ове дефиниције су сагласне у ставу да стање инсулинске резистенције које се јавља током перипарталног периода онемогућава коришћење глукозе од стране инсулин зависних ткива, али да са друге стране омогућава преусмеравање глукозе у гравидни утерус и млечну жлезду током гравидитета и лактације (Lemosquet и сар., 2002).

Молекуларни механизми настанка инсулинске резистенције која се јавља током гравидитета код великог броја животињских врста још увек нису разјашњени. Истраживања изведена на пацовима указују да је број и заступљеност IR непромењен у условима инсулинске резистенције током гравидитета, али да постоје промене у почетним деловима сигналног пута нисходно од IR у скелетним мишићима (Musial и сар., 2016, Friedman и сар., 1999).

Улазак глукозе у ћелије је посредован глукозним транспортерима.

Мишићно и масно ткиво претежно садрже GLUT4 (који је задужен за инсулином-посредован унос глукозе) и у малој количини GLUT1 који служи за основни унос глукозе. С друге стране, млечна жлезда у лактацији, фетална ткива и јетра садрже GLUT1, 2 и 3 који се изражавају на ћелији независно од концентрација инсулина у циркулацији (Duehleimier и сар., 2005, Zhao и Keating, 2007). Иако инсулин

нема директан утицај на млечну жлезду и стварање млека код преживара (McGuire и сар., 1995) услед његових ниских концентрација након тељења смањена је и експресија GLUT4 у периферним ткивима чиме глукоза из циркулације постаје доступнија млечној жлезди (Nishimoto и сар., 2006, van Knegsel и сар., 2007) за синтезу лактозе. Након тељења, са почетком лучења млека, од 5 до 100 пута се повећава експресија инсулин независних GLUT1 на плазма мембрани епителних ћелија алвеола млечне жлезде (Zhao и Keating, 2007). Транспорт глукозе који је независан од инсулина омогућава континуиран прелаз глукозе из циркулације у млечну жлезду, а све у циљу повећане синтезе млечног шећера, односно лактозе (Bauman, 2000). Лактоза је главни регулатор осмотског притиска који је одговоран за транспорт воде у млечну жлезду (Rigout и сар., 2002), а тиме и за количину произведеног млека (Drackley и сар., 2001, Brockman, 2005). Млечна жлезда услед недостатка глукозо-6 фосфатазе не може да синтетише глукозу из других прекурсора (Threadgold и Kuhn, 1979).

2.1.3. Липомобилизација у условима NEB

Иако краве мобилизацијом телесних резерви у одређеном обиму могу да смање разлику у количини доступне и неопходне енергије, липомобилизација често нарушава метаболичку равнотежу саме животиње (Шаманц и сар., 2000).

У експериментима McNamara (1995) је утврђено да код високомлечних раса крава повећана осетљивост масног ткива на инсулин условљава и њихову високу продуктивност. Наиме, ослабљен одговор инсулин зависних ткива на инсулин омогућава ослобађање NEFA из масног ткива, како би се надокнадиле потребе у енергији током периода смањеног уноса хране. Повишене концентрације NEFA погоршавају насталу инсулинску резистенцију (Kokkonen и сар., 2009, Pires и сар., 2007). Концентрације NEFA код крава расту пре тељења, а на највишем нивоу су од 1. до 3. недеље после тељења (Ingvarsen и сар., 2003), када је организам најизложенији њеном неповољном утицају. Повећање концентрације NEFA и до 123 % на почетку лактације, у односу на вредности пре тељења, се сматра физиолошким (Rukkwamsuk и сар., 1999).

Концентрације NEFA у циркулацији се до средине лактације значајно смањују, а одговор ткива на инсулин се поправља (Sasaki, 2002).

Иако ткива могу користити NEFA као алтернативни извор енергије, у већим концентрацијама она се сматра токсичном (Bell, 1995, Overton, 2001). Начин на који се NEFA негативно одражава на инсулинску сигнализацију је предмет бројних истраживања изведених последњих година на лабораторијским глодарима и људима. Слободне масне киселине (*FFA-Free fatty acid*) имају негативан утицај на ширење сигнала са активiranог IR. Наиме, у истраживањима Capurso С.и Capurso А., (2012) установљено је да су FFA одговорне за настанак инсулинске резистенције, с обзиром на то да активирају серин киназе (протеин киназа, JNK и ИКК-(I kappa B kinase)) које изазивају фосфорилације на Ser³⁰⁷ IRS-1 чиме онемогућавају даљи пренос сигнала. У досадашњој литератури нису објављени поуздани подаци о значају NEFA у појави инсулинске резистенције код преживара, али поједини истраживачи (Kräft, 2004, Vernon и сар., 1990) су мишљења да је, као и код људи и лабораторијских глодара, NEFA одговорна за промене у унутраћелијском сигналном путу инсулина.

Ослобођене NEFA се у циркулацији везују за албумине плазме, а мала количина NEFA се транспортује као невезани мономерни облик (Richieri и Kleinfeld, 1995) који циркулацијом доспева до свих ткива (Drackley и сар., 2001). Полуживот NEFA у циркулацији износи од 2 до 4 минута (Karpe и сар., 2011).

С обзиром на то да се након тељења и са отпочињањем лактације проток крви у јетри дуплира (Reynolds и сар., 2003), хепатоцити појачавају своју метаболичку активност, што за последицу има улазак велике количине NEFA (које воде порекло из TG масног ткива) у јетру.

У јетриним ћелијама NEFA може бити потпуно оксидована у Кребсовом циклусу до CO₂, уз ослобађање енергије, или делимично оксидована до кетонских тела: ацетона, ацетоацетата и ВНВА (Hanigan, 2004) након чега се секретују у крвоток. Уколико је у већем обиму у јетри заступљена делимична оксидација NEFA и у циркулацији се појављују кетонска тела у већој концентрацији, а настало стање се означава као кетоза. Настала кетонска тела могу бити корисна, с обзиром да поједина ткива (скелетни мишићи, бубрези, срце и дигестивни тракт преживара) могу да их оксидују (Heitmann

и сар., 1987) и користе као извор енергије за потребе ћелија, штедећи притом глукозу за производњу млека (Herdt, 2000a).

Осим оксидације, NEFA у циркулацији могу поново да се претворе у TG који се као липопротеини са врло малом густином (*VLDL – Very low density lipoproteins*) могу поново дистрибуирати у крвоток или депоновати у јетри (Drackley, 1999, Grummer, 1993). Стварање резерви TG у јетри може бити узрок оштећења њене функције, које се огледа кроз смањење обима глуконеогенезе (Cadorniga Valino и сар., 1997) и онемогућавање стварања урее (Strang и сар., 1998). Наиме, поред смањене производње глукозе путем глуконеогенезе, смањује се способност детоксикације амонијака у периоду када је глуконеогенеза најинтензивнија и када аминокиселине постају доминантни супстрати за синтезу глукозе. За разлику од непрживара, јетра крава, оваца и коза има смањену способност уклањања TG путем VLDL (Emery и сар., 1992, Rukkamsuk и сар., 1999) и може депоновати TG у количини еквивалентној 6 % укупне масе јетре сваког дана (Drackley, 2001). Уколико се током транзиционог периода (3 недеље пре до 3 недеље после тељења) не спроведе терапија поремећаја масне јетре ово стање може бити увод у настанак метаболичких, репродуктивних и инфективних обољења (Кировски и Сладојевић, 2017).

Телесне масти из телесних депоа се разлажу све до 10., 11. недеље после тељења након чега се постиже равнотежа између уноса хране и количине синтетисаног млека.

2.1.4. Глуконеогенеза у условима NEB

Глуконеогенеза је код преживара процес који је од огромног значаја у смислу снабдевања организма глукозом, па формирање глукозе из прекурсора који су формиран у метаболичким реакцијама у периферним ткивима представља други вид прилагођавања високомлечних крава на високе енергетске захтеве на почетку лактације (Wallace и Burritt, 2002).

Повећане концентрације хормона раста у циркулацији одмах након тељења (Gross и сар., 2011) повећавају интензитет глуконеогенезе у јетри и смањују липогенезу у масном ткиву (Renaville и сар., 2002). Глуконеогенеза се претежно одвија у јетри, мада се мањи део (око 15%) одвија и у кори бубрега (Haymond и Sunehag,

1999). Тиме се обезбеђује глукоза која ће бити на располагању свим ћелијама у организму, и доступна за синтезу лактозе млека или за складиштење.

Супстрати неопходни за глуконеогенезу у јетри преживара су пропионат из ферментације у бурагу (60-74 %), L лактат настао у Коријевом циклусу (16-26 %), аминокиселине настале из катаболизма протеина: аланин (3-5 %), валерат и изобутират (5-6 %), али и глицерол ослобођен приликом разградње масног ткива (0,5-3 %) (Larsen и Kristensen, 2009).

Током прва два месеца лактације, производња глукозе у јетри се повећава за најмање два пута (Schulze и сар., 1991).

Гликемија крава и осталих преживара је нижа око 30 % у поређењу са гликемијом људи и пацова (Nocquette и сар., 1996) и износи од 2,2 до 3,3 mmol/L. Стога одржавање гликемије представља велики изазов за високомлечне расе крава посебно током периода ране лактације када су и потребе за глукозом највеће. У преджелуцима преживара присутни микроорганизми (претежно бактерије) ферментују несварљиве угљене хидрате (целулозу и хемицелулозу) из житарица до испарљивих масних киселина VFA (*VFA-Volatile fatty acid*) од којих се највише ствара сирћетна (70 %), пропионска (20 %) и бутерна киселина (10 %) (Bergman, 1974). Сирћетна и бутерна киселина су липогене и од њих ће се синтетисати масти, док је пропионска гликогенопластична киселина и прекурсор је за синтезу глукозе (Шаманц и сар., 1998). VFA учествују у значајној мери (и до 70 %) у укупном калоријском уносу код крава (Bergman, 1990). Највећа количина глукозе код преживара се обезбеђује кроз процесе глуконеогенезе у јетри као и кроз гликогенолизу (Aschenbach и сар., 2010), с обзиром на то да ресорпцијом из дигестивног тракта преживари добијају недовољну количину глукозе.

Код преживара глуконеогенеза је најинтензивнија након храњења када се ствара највише пропионата, док је код непреживара овај процес заступљенији у условима гладовања и смањеног енергетског уноса. С обзиром на физиолошки ниске концентрације глукозе у циркулацији и губитак апетита у периоду око тељења, глуконеогенеза код преживара је у том периоду најинтензивнија и њоме се обезбеђује највећа количина глукозе за потребе млечне жлезде (Reynolds и сар., 1988).

Код одраслих преживара глуконеогенеза има и улогу у спречавању негативних последица системског нагомилавања пропионата (Allen и сар., 2005).

Током периода ране лактације код преживара се дешавају интензивна прилагођавања хормонално-метаболичког система, па тај период карактерише и повећана могућност настанка великог броја обољења. Успешност прилагођавања крава током транзиционог периода има утицај на здравље и продуктивност крава, а самим тим и на економичност производње, уз могућност утицаја на продуктивност током наредне лактације.

2.2. Синтеза, секреција и структура и сигнални пут инсулина

Инсулин је анаболички пептидни хормон који се синтетише и ослобађа из Лангерхансових острваца панкреаса и учествује у регулацији одређених метаболичких процеса (транспорту глукозе, синтези гликогена, липолизи), али и у расту, митогенези и експресији гена у великом броју ткива сисара (Nakae и сар., 2001). Код крава, оваца и коза, односно врста са смањеном концентрацијом глукозе, стимулатори секреције инсулина су масне киселине са 3 до 8 угљеникових атома (Nogino и сар., 1968), али и кетонска тела (Aguggini и сар., 2000). За разлику од њих, код осталих животињских врста и људи стимулација лучења инсулина је под утицајем повишених концентрација глукозе као и појединих аминокиселина, ацетилхолина, хормона из дигестивног тракта (Muniyappa и сар., 2007), али и под утицајем стреса. Осим хранљивих материја, на синтезу и секрецију инсулина код непреживара утичу и хормони, холинергички и адренергички путеви као и катјонске аминокиселине. Путем порталне вене из панкреаса инсулин доспева у циркулацију. Полуживот инсулина је кратак и износи између 4 и 6 минута (Hulse и сар., 2009), с обзиром на то да се у циркулацији налази у слободном облику (Duckworth, 1988).

Инсулин се разлаже и уклања под утицајем ензима цинк металопротеаза (*IDE - insulin-degrading enzyme*). Овај ензим је изразито очуван и осим код животиња присутан је и у бактеријама, гљивама и биљкама (Mirski и Broh-Kahn, 1949). Mirski и Broh-Kahn (1949) су први пут указали на способност IDE да разложи инсулин. Ово

откриће је постало доказ да IDE учествује у одржавању концентрација инсулина. Заступљеност IDE на нивоу ћелије је највећа у цитосолу (~95 %), али се може наћи у незнатном проценту (од 1 % до 5 %) у ендозомима, пероксизомима, митохондријама, али и на површини ћелије (Sudoх и сар., 2002, Leissring и сар., 2004). Најизраженију активност овај ензим остварује у јетри и бубрезима.

IDE препознаје тродимензионалну структуру инсулина која је неопходна за везивање и разградњу протеина (Duckworth и сар., 1988). Након везивања инсулина за каталитички центар IDE у коме се налази цинк, ензим пролази кроз значајну конформациону промену која омогућава правилно препознавање супстрата и његово нековалентно везивање за две области унутар IDE чиме се омогућава разлагање инсулина. Овај ензим има способност да разложи и поједине пептиде и хормоне укључујући IGF I и II (Guo и сар, 2010), TGF (*TGF- transforming growth factor α*) (Guo и сар, 2010), β амилоид пептид (*β amyloid peptide*) али и глукагон (Duckworth и сар., 1998; Shen и сар., 2006, Hulse и сар., 2009).

На ћелијском нивоу, инсулин започиње регулацију метаболизма, везивањем за IR који су смештени на мембранама различитих типова ћелија: мишићног и масног ткива, јетре, мозга, срца, ендотела крвних судова, као и на β ћелијама панкреаса. Распоређеност IR на различитим ткивима омогућава да се усклади метаболизам и одржи хомеостаза (Prodi, Obici 2006, Kahn и сар., 2006, Muniyappa и сар., 2007) у различитим физиолошким стањима.

2.2.1. Рецептор за инсулин (IR)

Cuatrecasas (1972) је у ћелијама масног ткива показао да се инсулин везује за гликопротеин који се налази на површини ћелије. То је први директни доказ о постојању IR и доказ о његовој интеракцији са инсулином. IR је хетеротетрамер и смештен је на мембранама бројних типова ћелија (јетре, скелетних мишића и масног ткива), али и на другим ћелијама што омогућава остваривање плејотропних ефеката инсулина (DeMeys, 2016). Постојање рецептора је неопходно за везивање инсулина и остваривање ефеката овог хормона унутар ћелија. Рецептор чине два α и два β ланца који су међусобно

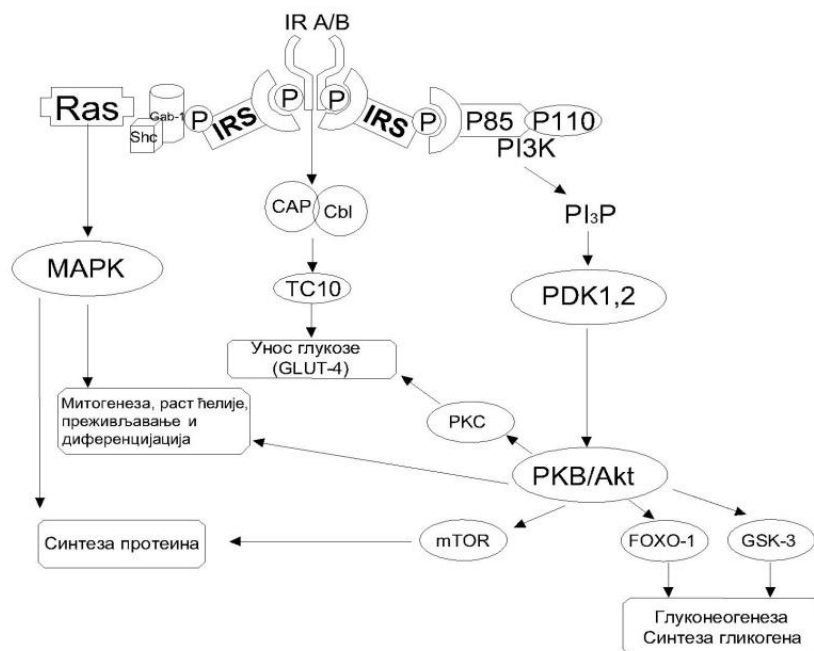
повезана дисулфидним везама (Kido и сар., 2001). Везивање инсулина за ванћелијску α субјединицу рецептора (која поседује део богат цистеином који формира место за везивање инсулина) је неопходан и почетни корак у инсулинском сигналном путу. Формиран комплекс хормона и рецептора утиче на промену просторног облика рецептора, доводећи до аутофосфорилација које омогућавају да се АТФ веже за трансмембранску β субјединицу (Lee и сар., 2014). Тиме рецептор постаје активна тирозин киназа која даље кроз ланчане реакције фосфорилације и дефосфорилације нисходних молекула (секундарних гласника) доводи до биолошког одговора ћелије која је претходно стимулисана инсулином (Kahn, 1985).

У литератури су описана три сигнална пута инсулина унутар ћелије која потичу са активираних IRS.

(1) пут фосфатидил инозитол 3 киназе (PI3K) (*PI3K-phosphatidylinositol-3-kinases*), који је неопходан за остваривање акутних (анаболичких) ефеката инсулина у ћелији чиме се постиже регулација интермедијарног метаболизма (транспорт глукозе, синтеза липида, протеина и гликогена) (Burks и White, 2001)

(2) пут митогеном активираних протеин киназа MAPK (*MAPK- mitogen-activated protein kinase*) чијом фосфорилацијом инсулин остварује хроничне неметаболичке ефекте унутар ћелије: експресију гена, ћелијски раст и диференцијацију (Boucher и сар., 2014).

(3) Cbl/CAP пут који контролише транслокацију GLUT4 на ћелијској мембрани (Saltiel, Kahn, 2001, Liu, 2002, Taniguchi и сар., 2006, Leclercq, 2007, Lee и сар., 2012).



Слика 1. Основни сигнални путеви инсулина

Након везивања инсулина, цитоплазматични киназа домен активаног IR фосфорилише неколико остатака тирозина, који представљају места везивања IR за нисходне протеине. Фосфорилисани протеини који реагују са IR (укључујући и супstrate инсулинског рецептора) (IRS) 1–6, Shc, Cbl, p62 dok, или Gab-1, могу да активирају три главна сигнална пута: (1) пут фосфатидилинозитол-3-киназе (PI3K) који је углавном укључен у контролу метаболичких активности инсулина (метаболизам глукозе, липида и протеина), транскрипције GLUT4, синтезе протеина (преко mTOR) и контроле преживљавања ћелија, (2) пут митоген активирајуће протеин киназе (MAPK) неопходан за раст и диференцијацију ћелија, и (3) пут CAP/Cbl/Tc10 који контролише транслокације GLUT4 у ћелијама које експримирају GLUT4. (Преузето и прилагођено од: Leclercq и сар., 2007)

2.2.2. Супстрати инсулинског рецептора (IRS)

Супстрати инсулинског рецептора (IRS) (*IRS-Insulin receptor substrate*) су неопходни посредници у даљем преносу сигнала са активаног IR (Myers и сар., 1996, Zhefu и сар., 2006), с обзиром на то да након фосфорилације ови протеини постају места „усидравања“ унутарћелијских протеина који имају SH-2 домен (*Src-homology-2 (SH-2) domains*). Фосфорилисани IRS привлачи бројне сигналне молекуле ка својим фосфорилисаним доменима омогућавајући даље ширење сигнала са активаног IR

према нисходним молекулима инсулинског сигналног пута (Kahn и сар., 1994, Draznin, 2006). До сада је описано 6 IRS протеина (IRS 1-6) (Lanzerstorfer и сар, 2015, Boucher и сар., 2014) који су различито распоређени унутар организма. IRS-1 протеин је најзаступљенији у мишићима, док се IRS-2 налази у јетри, мишићима и масном ткиву. IRS1-4 протеини доводе до даљег ширења сигнала (Myers и сар., 1996), док IRS-5 (DOK4) (*DOK4-Docking protein 4*) и IRS-6 (DOK5) (*DOK5-Docking protein 5*) се појављују у релативно мањем броју ткива (Cai и сар., 2003) и имају слабију активност. Фосфорилација на Ser³⁰⁷ унутар IRS-1 значајно слаби инсулински сигнал (Aguirre и сар., 2000) и онемогућава активацију метаболичког пута инсулина (PI3K) након стимулације ћелије инсулином (Hotamisligil и сар., 1996, Sykiotis и Papavassiliou, 2001).

У литератури су описане и добро проучене две могућности фосфорилације IRS које за последицу имају остваривање два потпуно супротна ефеката који ће се различито одразити на даљи пренос сигнала (Pederson и сар., 2001, Zick, 2005).

Наиме, фосфорилација на тирозину (Tyr⁶⁰⁸/Tyr⁶²⁸/Tyr⁶⁵⁸) IRS-1 је одговорна за даљи пренос сигнала, док фосфорилација на Ser³⁰⁷ слаби инсулинску сигнализацију и онемогућава даље фосфорилације молекула инсулинског сигналног пута (Rui и сар., 2001). Поједине унутарћелијске серин киназе: mTOR (Rajan и сар., 2013), JNK (Aguirre, 2002, Nguyen и сар., 2005), имају могућност активације IRS-1 на Ser³⁰⁷, док TNF α (Qi и Pekala, 2000, Nguyen и сар., 2005) индиректно након активације серин/треонин киназа (JNK или p38) покрећу фосфорилације на Ser³⁰⁷ IRS-1.

Фосфорилација на Ser³⁰⁷ IRS-1 код људи је праћена поремећајем FFA, диацилглицерола, глукозе и церамида у ћелији (Shulman, 2000). Поред тога што фосфорилација на Ser³⁰⁷ „гаси“ инсулинску сигнализацију она и убрзава разградњу IRS-1 која је посредована UPS (*UPS-ubiquitin-proteasome system*) (Rui и сар., 2001, Shah и сар., 2004).

2.2.3. Протеин киназа Б (АКТ)

Протеин киназа Б (АКТ) је неопходна за активност инсулина (Katome и сар., 2003) и позната је киназа која се налази на путу PI3K. Сигнал се са IRS-1 преноси на PI3K и даље на Ser⁴⁷³ АКТ што представља неопходан услов за транслокацију везикула GLUT4 из унутарћелијских депоа на ћелијску мембрану инсулин сензитивних ткива. Тиме је омогућен улазак глукозе у ћелије (Chen и сар., 2006, Kumar и сар., 2006).

У ћелији, АКТ контролише бројне метаболичке процесе: синтезу гликогена, протеина и масти у мишићном и масном ткиву, као и хепатичну глуконеогенезу (Burks и White, 2001). На тај начин АКТ активно учествује у регулацији концентрације глукозе у крви, али и онемогућава разградњу TG масног ткива. АКТ, као и IRS протеини, има могућност двоструке фосфорилације, и то на Thr³⁰⁸ и на Ser⁴⁷³.

Преко АКТ, инсулин стимулише ензим гликоген синтазу чиме омогућава синтезу гликогена у ћелији. Активирани АКТ фосфорилише и инактивише киназу 3 гликоген синтазе (GSK-3) (*GSK-3 Glycogen synthase kinase 3*) и/или протеин киназу А (РКА) (*PKA-protein kinase A*) и онемогућавајући на тај начин фосфорилацију која би инактивисала гликоген синтазу. АКТ преко фосфорилације FOXO-1 (*FOXO-1 Forkhead box protein O1*) има утицај на транскрипцију појединих ензима глуконеогенезе (Barthel и сар., 2001) фосфоенолпируват карбокси-киназе PEPCK (*PEPCK-Phosphoenolpyruvate carboxykinase*) и глукоза-6-фосфатазе чиме не дозвољава синтезу глукозе у хепатоцитима и њен излазак у циркулацију.

2.2.4. GLUT

Глукоза пролази кроз ћелијску мембрану енергетски независним транспортом односно олакшаном дифузијом (Hruz и Mueckler, 2001), користећи GLUT (Mueckler и Thorens, 2013). Наиме, хидрофилне особине глукозе онемогућавају њен пролазак простом дифузијом кроз липидни двослој ћелијске мембране. До сада је код људи описано 13 GLUT, који осим глукозе транспортују и друге молекуле (фруктозу,

миоинозитол и урате) (Thorens и Mueckler, 2009). Недавна истраживања (Ostrowska и сар., 2015) потврђују постојање 13 аналогних протеина GLUT код крава. Све ћелије унутар организма на својој површини имају протеине преко којих се остварује транспорт глукозе, а њихов распоред у организму је различит. Поједине ћелије (еритроцити, мозак и бубрежне ћелије) користе искључиво глукозу као извор енергије. Транспортери за глукозу се могу поделити у две групе: инсулин зависне (GLUT4) и инсулин независне (GLUT1-3 и 5-12).

Хормон зависни глукозни транспортер GLUT4 се налази искључиво на мембранама мишићних (скелетних мишића и срца) и масних ћелија и посредује у контроли гликемије како преживара тако и непреживара (Sasaki, 2002). Различита распоређеност појединих типова GLUT протеина омогућава деловање инсулина само у одређеним ткивима (Ostrowska и сар., 2015).

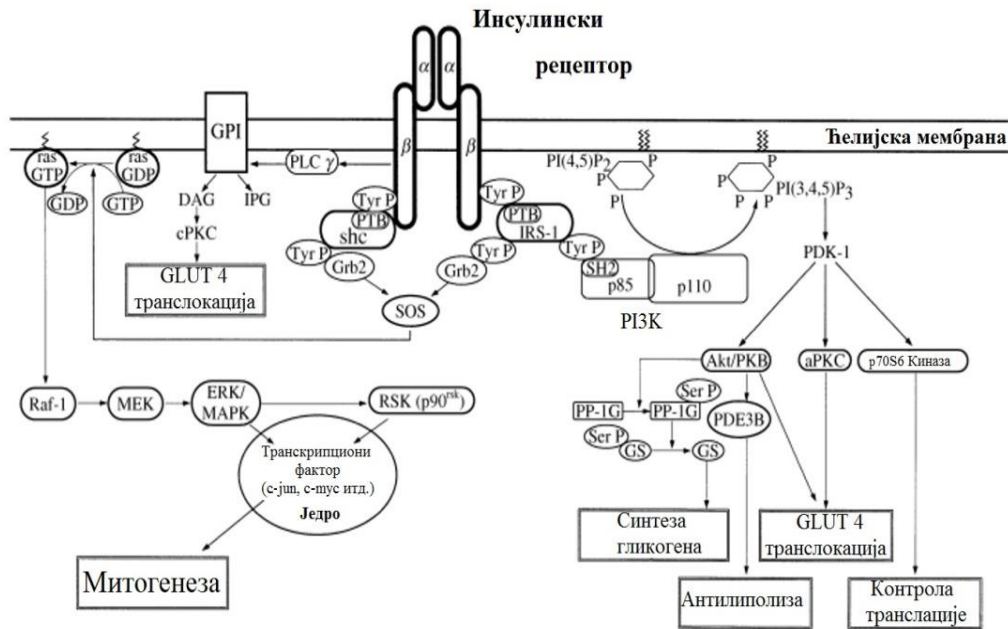
Ранија истраживања (Komatsu и сар., 2005, Nishimoto и сар., 2006, van Kneegsel и сар., 2007) указују да је најзаступљенија изоформа GLUT протеина у организму GLUT1 који је инсулин независни транспортер глукозе (Abe и сар. 2001, Duhlmeier и сар., 2005). Ова изоформа GLUT је најзаступљенија у преовладава у највећем броју ткива и органа: еритроцитима, мозгу, плаценти, млечној жлезди, али је такође високо заступљен и у масном ткиву говеда и гликолитичким типовима мишићних влакана која су заступљенија у појединим мишићима (*m. longissimus dorsi* и *m. semitendinosus*) о чему сведоче резултати истраживања Duhlmeier и сарадника (2005). У оксидативним типовима мишићних влакана (*m.masseter* и *diaphragma*) код преживара преовладава GLUT4. Код непреживара у мишићним влакнима и масном ткиву је предоминантан GLUT4. Осим GLUT4 у миоцитима и адипоцитима се могу наћи и други протеини од којих ће зависити улазак глукозе. У мишићном ткиву се могу пронаћи и GLUT1, GLUT5 и GLUT12 (Stuart и сар., 2006), а у масном ткиву још и GLUT8, GLUT12 и НМИТ (H^+ /*myo-inositolco-transporter*) (Uldry и сар., 2001, Wood и Trayhurn, 2003). Ниска гликемија и инсулинемија одржава GLUT4 у унутрашњости ћелије (Huang и Czech, 2007) где су густо спаковани у везикуле (Kandror, Pilch 1996). Везивањем инсулина за IR на мембрани инсулин сензитивних ткива, долази до значајног повећања егзоцитозе везикула на површину ћелијске мембране (Chen и сар.,

2006). Након завршене стимулације инсулина протеини GLUT4 се враћају у своје унутар ћелијске депое процесом ендоцитозе, чиме се онемогућава даљи улазак глукозе у периферна ткива (Watson и Pessin, 2001).

2.2.5. Метаболички пут након активације рецептора за инсулин

Све док је инсулин везан за IR односно док га протеазе не разграде, настају фосфорилације тирозинских остатака на нисходним протеинима IRS-1 и IRS-2. Фосфорилисани IRS-1 протеини посредују у повезивању IR са другим секундарним гласницима унутар ћелије. Везивање SH2 домена PI3K за фосфорилисане тирозине IRS-1 активира овај ензим, чиме се повезује p85 регулаторна субјединица PI3K са IRS-1 што изазива пребацивање p110 каталитичке субјединице PI3K у плазма мембрану чиме се она активира и претвара фосфатидил инозитол 4,5-дифосфат у фосфатидил инозитол 3,4,5 трифосфат (PIP3) (*PIP3-Phosphatidyl inositol (3,4,5)-trisphosphate*) (Hirsch и сар, 2007). Повећани нивои фосфатидил инозитолних фосфолипида на ћелијској мембрани активирају фосфатидил инозитол зависну киназу-1 (PDK-1) (*PDK-1 Phosphoinositide-dependent kinase-1*) која даље фосфорилише и активира АКТ на Thr³⁰⁸ (Cohen, 2006). Активиран АКТ изазива фосфорилацију нисходних ефектора који доводе до транслокације GLUT4 из везикула у цитоплазми на површину ћелијске мембране и тиме регулише улазак глукозе у ћелије, а фосфорилацијом GSK-3 омогућава формирање гликогена (Youngren, 2007, Ниа и сар., 2012). Активација метаболичког пута инсулина преко PI3K омогућава транслокацију GLUT4, синтезу гликогена, протеина и липида, а преко контроле транскрипције ензима глуконеогенезе постиже се и контрола овог процеса у јетри и спречава разградња TG из депоа масног ткива (Kido и сар., 2001).

Комплекс лиганд-рецептор се уклања из ћелијске мембране одмах након отпочињања фосфорилација нисходних молекула инсулинског сигналног пута. Комплекс се најпре из мембране повлачи у цитоплазму, а након тога се у ендозомима врши његова разградња. Завршну фазу овог процеса прати дефосфорилација IR и његово поновно инкорпорисање у ћелијску мембрану (Carpentier, 1994).



Слика 2. Детаљни схематски приказ инсулинског сигналног пута.

IRS-1, супстрат инсулинског рецептора; PI3-kinase, фосфатидил инозитол 3' киназа; p85, PI3-киназа регулаторна субјединица; p110, PI3-киназа каталитичка субјединица; PDK1, фосфоинозитид зависна киназа 1; аPKC, атипична протеин киназа C; АКТ/ПКВ, Протеин киназа B; PP-1G, Протеин фосфатаза-1G; GS, гликоген синтаза; PDE3B, фосфодиестераза 3B; Shc, src хомологни и колаген везујући протеини; Grb2, фактор раста везујући протеин-2; SOS, Son of sevenless; MAPK, митогеном активирани протеин киназа; ERK, екстраћелијским синалом регулисана протеин киназа; MEK, MAP киназа; RSK(p90rsk), рибозомална S6 киназа; PLC γ , фосфолипаза C γ ; GPI, глицеролфосфатидил инозитол; IPG, инозитол фосфо гликан; DAG, диацил глицерол; РТВ, фосфотирозин везујући домен; SH2, src хомологни 2 домен; GLUT4, инсулин осетљиви глукозни транспортер (преузето и прилагођено из рада: Shinichi Sasaki, 2002).

2.3. Хром

Микроелементи су неопходни за одвијање биохемијских реакција као и у одржавању физиолошких и метаболичких функција у организму. Због тога њихов недостатак може оставити негативне последице на здравље, производњу и репродукцију код животиња и људи.

Током низа претходних година значајан истраживачки напор је био усмерен на процену неопходности појединих микроелемената у исхрани животиња и људи као и на процену неопходних количина у смислу задовољења различитих метаболичких активности. Значај и неопходност употребе појединих микроелемената у исхрани је и данас једна од битнијих тема о којима се дискутује на научним скуповима.

Мишљење Европског органа за сигурност хране за животиње (EFSA, 2009) и за људе (EFSA, 2014) је да хром није есенцијални микроелемент, с обзиром на то да не постоји директан доказ постојања корисних ефеката хрома након примене код здравих јединки.

Хром је откривен 1798. године (Berzelous, 1999) и првобитно је коришћен као пигмент. Хром спада међу 17 најзаступљенијих елемената у Земљиној кори (Avudainayagam и сар., 2003). У природном стању се јавља као хромит у серпентинским и ултраморфним стенама (Babula и сар., 2008). Хромит који представља минерал добијен из руде углавном се састоји из гвожђа и тровалентног хрома са минималним количинама алуминујума и магнезујума (NRC, 2005).

Хром је метал без мириса и укуса. Може се јавити у неколико хемијских облика који показују различита оксидациона стања од -2 до +6, а најчешће се налази у +2, +3 и +6 стањима (Borel и Anderson, 1984). У природном стању су стабилни само елементарни хром, тровалентни и шестовалентни облик хрома (Skovbjerg и сар., 2006), а они се међусобно разликују по токсичности и механизмима транспорта кроз ћелијску мембрану (Parassipoi и сар., 2009). Елементарни хром (Cr^0) није природно присутан у земљиној кори и биолошки је инертан тј. не може се апсорбовати и нема хранљиву вредност (Ducros, 1992). Шестовалентни хром природно не постоји у значајнијој количини већ се добија оксидацијом тровалентног хрома загревањем у базној средини

и најчешћу примену има у индустрији, односно у изради нерђајућег и тврдо легираног челика, штављењу коже, производњи одређених пигмената и текстилних боја, керамичких глазура, ватросталних опека (Avudainayagam и сар., 2003). Шестовалентни хром се емитује у ваздух не само као последица индустријских загађења већ и током сагоревања, укључујући и шумске пожаре (WHO, 2009). Шестовалентни облик хрома представља јако оксидационо средство које у форми хромата и дихромата продире у биолошке мембране и реагује са компонентама ћелије (нуклеинским киселинама или протеинима) све док се не редукује до тровалентног хрома.

Најчешћи начин уласка шестовалентног хрома у организам човека или животиња је путем инхалације приликом индустријског тровања. Последице које притом изазива су улцерације носне преграде, запаљење слузокоже носне дупље, хронични бронхитис и емфизем (Von Burg и Liu, 1993). Истраживања (Langard и Norseth, 1979) потврђују да удисање шестовалентног хрома може узроковати бронхијалне карциноме људи који су запослени у ватросталној и хемијској индустрији или у металургији.

За разлику од шестовалентног хрома, тровалентни хром представља најстабилније оксидационо стање у коме је хром присутан у живим организмима. Количине у којима се уноси су знатно мање од токсичне дозе. Сматра се да у овој форми хром није токсичан због слабе ресорпције из дигестивног тракта која је узрокована малом реактивношћу и тешкоћама при проласку кроз ћелијску мембрану (Mertz, 1992). Ова особина тровалентног хрома га чини погодним као дијагностичко средство у проучавању процеса варења хране (Furnival и сар., 1990а, б, Pechova и Pavlata, 2007). Тровалентни облик хрома је природно присутан у бројним намирницама: жуманцету, производима од целог зрна житарица, месу, броколима, пивском квасцу, кафи као и појединим винима и пиву (Cefalu и Hu, 2004).

Schwarz и Mertz (1959) су у својим истраживањима на лабораторијским пацовима установили да је хром есенцијални минерал који је неопходан за метаболизам угљених хидрата и масти, али је тек 1977. године јасно показана значајна улога хрома и код људи (Jeejeebhoy и сар., 1977). Ова потврда је стигла након увођења процедуре намењене пацијентима на интензивној нези који из различитих разлога нису

могли да узимају храну преко уста. Жена која је добијала интравенски раствор који јој је обезбеђивао све хранљиве материје (протеине, масти, угљене хидрате, витамине и минерале) неопходне за метаболизам током периода од 5 година развила је симптоме дијабетеса, периферне неуропатије, хипергликемије, имала је и повећане концентрације FFA у крви као и значајан губитак у тежини. Примењена терапија (инсулина) код ове пацијенткиње није давала очекиване резултате. Додавањем хрома у облику хлорида у малој количини (око 250 μ g) у раствор за парентералну исхрану током периода од три недеље стање слично дијабетесу је почело да се поправља и више није било потребе за давањем инсулина (Окака и сар., 1994). Хром се данас редовно додаје у раствор за парентералну исхрану људи и животиња (Anderson, 1998).

2.3.1. Ресорпција хрома и биорасположивост

Истраживања преузета из хумане популације показују да је након пероралног уноса ресорпција хрома слаба и да се за неорганска једињења хрома креће у распону између 0,1 и 0,4 % од унете количине. Осим слабе ресорпције хрома из неорганских једињења, у истраживањима је потврђено да неоргански хром у бубрезима или јетри мора да се преведе у органски комплекс да би хром постао физиолошки функционалан (Vinson и Hsiao, 1985).

За разлику од неорганских једињења, ресорпција хрома код људи из органских извора је боља, и за хром пиколинат износи 2,8 %, а за хром који је органски везан у квасцу између 5 и 10 % (EC, 2003, EFSA, 2009), па смо се из тог разлога у нашем истраживању одлучили за овај облик.

Главни пут уласка тровалентног хрома у организам је преко дигестивног система. Хром се ресорбује из танког црева, највероватније пасивном дифузијом (Stoecker, 19996).

У крви се ресорбовани хром везује за протеине β_1 -глобулинске фракције плазме који су укључени у метаболизам гвожђа. Просечно је само око 30 % трансферина у циркулацији заузето у везивању и транспорту гвожђа, што указује на чињеницу да се и други метали транспортују путем овог протеина (Brock, 1985). Према *in vivo* и *in vitro*

истраживањима Feng и сарадника (2003) на пацовима око 80 % хрома присутног у циркулацији је везано за трансферин. Утврђено је постојање антагонизма између хрома и гвожђа и они се такмиче за трансферински рецептор (Sayato и сар., 1980). Clodfelder и Vincent су (2005) показали да су трансферински рецептори осетљиви на инсулин, а Kandror (1999) и Anderson (2003) да повећана концентрација инсулина у циркулацији утиче на промену локализације рецептора трансферина из везикула смештених у ћелији на ћелијску мембрану. Према моделу који је предложио Vincent, (2000 b, c) трансферин (за који је претходно везан хром) се везује за своје рецепторе на инсулин сензитивним ћелијама, а новонастали комплекс (трансферин-трансферински рецептор) ендоцитозом улази у ћелију. Активирањем АТФ зависне протонске пумпе у везикули, новонастала кисела рН средине разлаже овај комплекс и раздваја трансферин од свог рецептора и ослобађа хром у цитосол. Vincent (2000) је утврдио да се у цитосолу и једру инсулин сензитивних ћелија налази хромодулин у свом неактивном облику (апохромодулин). Хромодулин је олигопептид који се састоји од четири аминокиселине глицина, цистеина и аспартата и глутаминске киселине и који високим афинитетом може да веже четири јона хрома (Vincent, 2000, 2001). Везивањем четири атома хрома за хромодулин, он прелази у биолошки активну форму (холохромодулин) који везивањем за β субјединицу IR која је претходно активирана хормоном, одржава конформацију IR активном. Појачаном фосфорилацијом рецептора активирају се нисходни ефектори који доводе до транслокације GLUT4 из цитосолних везикула на ћелијску мембрану (Chen и сар., 2006) што доводи до повећања уноса и складиштења глукозе у ћелији (Hua и сар., 2012). Везивање холохромодулина за активно место тирозин киназе спречава деловање фосфатазе, и потенцира деловање инсулина (Anderson, 1998). Davis и Vincent (1997) су показали да холохромодулин од 3 до 8 пута повећава тирозин киназну активност IR. Бројна клиничка истраживања указују на то да хром, појачавајући унутарћелијски сигнални пут инсулина, може побољшати инсулинску сензитивност (Anderson, 2000, Mozaffari и сар., 2009). Смањење концентрације инсулина у циркулацији мења конформацију рецептора и елиминише хром из ћелије након чега се он излучује урином.

Након ресорпције хрома из органског извора повећава се и његова концентрација у ткивима (Ohh и Lee, 2005). После пероралног уноса највећи део нересорбованог хрома се екскретује фецесом (Mertz, 1969). Ресорбовани хром се брзо екскретује урином (Anderson 1983), а путем зноја и жучи се уклањају незнатне количине хрома (EFSA, 2009).

Поједини биолошки организми (квасци) имају способност да акумулирају јоне као што је хром у високим концентрацијама (Ingledew, 1999). Ова особина је омогућила производњу комерцијалних препарата који садрже велике количине биорасположивог хрома. Производња хрома органски везаног у квасцу се врши на тај начин што се у живу културу квасца стави неоргански извор хрома (хром-хлорид). При расту и размножавању, хром се уноси у ћелије квасца и на тај начин долази до повећања садржаја органски везаног хрома (Zinpro, 2003).

2.3.2. Депоневање хрома у организму

У истраживањима на пацовима је утврђено да се највеће концентрације хрома налазе у јетри, бубрезима и слезини (Kamath и сар., 1997), док се у мишићима, срцу, панкреасу, плућима, костима и мозгу запажају нешто ниже концентрације хрома (Feng, 2007). Код људи је потврђен сличан образац расподеле хрома (Lim и сар., 1983). Депоневање хрома у организму зависи од бројних фактора: начина уношења, хемијског облика и валентног стања хрома, али и од његових концентрација у крвној плазми (Yamaguchi и сар, 1983). Концентрације хрома у крви и ткивима никада нису исте (Underwood, 1977), а поуздан показатељ изложености организма хрому је његова концентрација у крви (Barceloux, 1999).

У истраживањима на мишевима Schrauzer и сарадници (1986) су утврдили да суплементација хрома може да смањи стресом узрокован уринарни губитак појединих микроелемената (бабра, цинка, мангана и гвожђа). До истог закључка су дошли и Moonsie Shageer и Mowat (1993) који су приметили да је губитак других минерала код телади током стресног периода мањи код животиња које су добијале хром.

2.3.3. Екскреција хрома

Највећи део перорално унетог хрома се нересорбован излучује путем фесеца (Offenbacher и сар., 1986), док се највећи део ресорбованог хрома излучује урином (Anderson и сар., 1983).

2.3.4. Утицај хрома на сигнални пут инсулина

Иако се у литератури појављују бројна истраживања утицаја хрома на метаболизам масти и угљених хидрата као и на млечност крава, молекуларни механизми тих процеса су и даље непознаница. Тачан механизам деловања хрома на сигнални пут инсулина још увек није прецизно дефинисан ни код једне животињске врсте, као ни код људи.

Претходна истраживања на лабораторијским глодарима су указала на директну повезаност количине хрома у организму са активношћу инсулина (Mertz, 1969). Roginski и Mertz (1969) су утврдили да додавање хрома као суплемента у исхрани лабораторијских глодара повећава уградњу аминокиселина у протеине мишића срца као и улазак аминокиселина у ткива, док су Mertz и сарадници (1974) закључили да је под утицајем хрома повећано искоришћавање глукозе у периферним ткивима. Anderson (1997) указује да је у присуству хрома повећан број IR, као и степен везивања инсулина за рецепторе. Стога је закључено да, уколико у организму има довољно хрома, инсулин може у концентрацијама које су ниже од физиолошких да оствари своје активности на ћелијском нивоу. Evans и Bowman (1992) су доказали да хром повећава флуидност мембране, олакшавајући контакт инсулина са својим рецептором на мембрани инсулин сензитивних ћелија. Поред овога, у истраживањима на хуманој популацији је установљено да хром повећава осетљивост β ћелија панкреаса, чиме се побољшава и секреција инсулина (Potter и сар., 1985). Davis и Vincent (1997) су, користећи изолован IR пацова, показали да хромодулин који је везан за активан IR повећава активност тирозин киназе чиме остварује позитиван утицај на инсулинску сензитивност.

Vincent (1999) доказује повећану тирозин киназну активност рецептора након везивања инсулина у присуству хрома. Скорија истраживања (Chen и сар., 2006) су показала да је у 3T3-L1 ћелијској линији повећан транспорт глукозе под утицајем хрома који побољшава мобилизацију GLUT4 везикула. У *in vitro* истраживању Chen и сарадника (2006) утврђено је да регулација глукозног транспорта није укључивала IR, IRS-1, PI3K ни АКТ, већ је смањење количине холестерола утицало на повећање флуидности ћелијске мембране и транслокацију GLUT4. Предложени су и други слични могући механизми деловања хрома на сигнални пут инсулина изведених у *in vitro* условима. Наиме, Pattar и сарадници (2006) су у својим истраживањима на 3T3-L1 ћелијским линијама утврдили да хром пиколинат (у ћелији која је претходно стимулирана инсулином) смањује садржај холестерола у ћелијској мембрани и модификацијом липидних депоа повећава транслокацију GLUT4 као и транспорт глукозе у ћелију чиме смањује инсулинску резистенцију која је изазвана липидима. Током ових истраживања је примећено и да хром утиче на протеине који су укључени у метаболизам холестерола (SREBP) (*SREBP-1 steroid regulatory element-binding protein*). Механизам смањеног присуства холестерола у мембранама ћелија под утицајем хрома, још увек није прецизно дефинисан.

Поједине *in vivo* и *in vitro* студије инсулинске резистенције и дијабетеса показале су да хром онемогућава активност негативних регулатора инсулинског сигналног пута (нпр. pIRS-1 Ser³⁰⁷) што намеће могући механизам којим хром побољшава инсулинску сензитивност (Hua и сар., 2012).

Wang и сарадници су (2014) у студији изведеној на дијабетичним мишевима коришћењем нове формулације инсулина за који је директно везан хром уместо цинка, указали да би хром могао да побољша сигнални пут инсулина онемогућавањем дејства IDE и UPS у јетри. Ова студија је указала да хром спречава разградњу инсулина за који је везан и смањује клиренс инсулина из циркулације што је последица смањене експресије IDE у јетри. Осим овога, спречава и разградњу IRS-1 и IRS-2 супресијом UPS у јетри. Крајњи ефекат коришћења хрома који је везан за инсулин је појачана инсулинска сензитивност и побољшан метаболизам глукозе током инсулинске резистенције.

2.3.4.1. Улога хрома у активацији IR

У присуству хрома инсулин се и до осам пута јаче везује за свој рецептор на мембрани инсулин сензитивних ткива (Davis и Vincent, 1997, Vincent, 2000). За разлику од хрома, апохромодулин (олигопептид за који није везан хром) нема способност покретања ензимске активности IR (Davis и Vincent, 1997). Davis и сар., 1997 и Davis и Vincent (1997a) су показали да хром активира тирозин киназу IR након његове активације, и да у ћелијама масног ткива инактивира мембранску фосфотирозин фосфатазу (Davis и сар., 1996). Vincent (2000 b,c) предлаже модел по коме хромодулин појачава тирозин киназну активност IR. Наиме, холохромодулин који представља биолошки активну форму хромодулина, везивањем за активiranу β субјединицу IR, одржава конформацију IR активном и појачава његову тирозин киназну активност. Бројна истраживања потврђују утицај хрома на почетни део каскаде сигналног пута инсулина (Davis и сар., 1996, Wang, 2005, Chen и сар., 2009).

2.3.4.2. Утицај хрома на IRS-1, АКТ и PI3K

У бројним *in vivo* и *in vitro* студијама нутритивних модела дијабетеса изведених на лабораторијским глодарима показано је да различите формулације органског тровалентног хрома имају позитиван утицај на пострецепторски инсулински сигнални пут у мишићном и масном ткиву. Утицај хрома у истраживањима на лабораторијским животињама посматран је у условима за које је познато да мењају инсулинску сигнализацију (хипергликемија, хиперлипидемија и хиперинсулинемија).

Активност хрома на инсулински сигнални пут се огледа у активацији фосфорилација тирозина IRS-1, фосфорилација Thr³⁰⁸ и Ser⁴⁷³ АКТ као и активности PI3K, али и смањеним фосфорилацијама на Ser³⁰⁷ IRS-1 која је позната као негативан регулатор инсулинског сигналног пута (Hua и сар., 2012).

У студији из 2006 коју су спровели Wang и сарадници на дебелим пацовима соја JCR:LA-ср хром пиколинат је утицао на побољшање фосфорилација IRS-1 и активност PI3K у скелетним мишићима, али није довео до повећања садржаја протеина IRS-1, PI3K и АКТ.

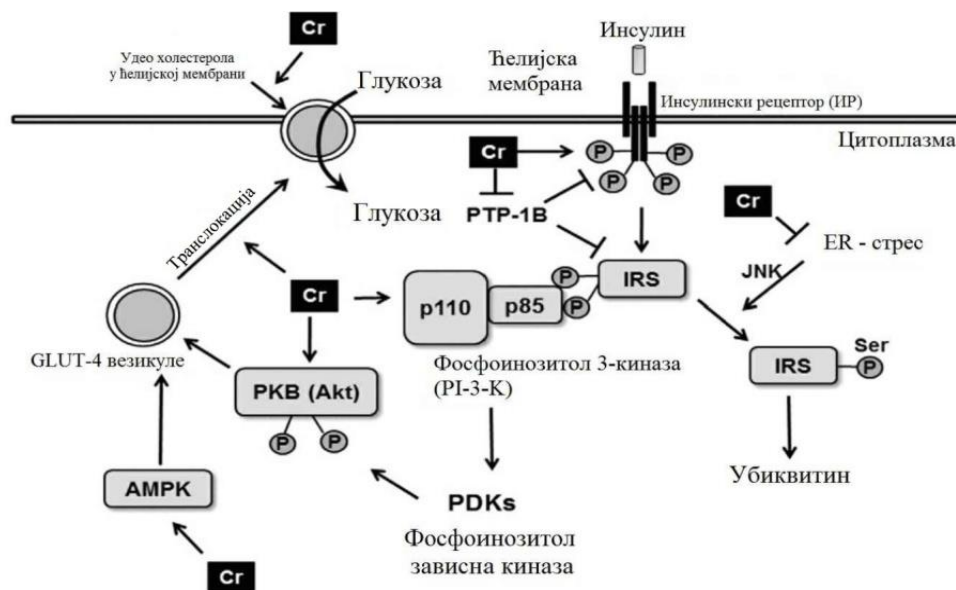
Chen и сарадници (2009) и Maskowiak и сарадници су (2010) показали да хром стимулише тирозинску фосфорилацију IRS-1 која је задужена за даљи пренос фосфорилација са активiranог IR чиме побољшава допремање глукозе у ћелију, док је у истраживањима Sreejaan и сарадника (2008) и Chen и сарадника (2009) показано да хром, осим што позитивно утиче на фосфорилацију тирозина, да супримира и фосфорилацију на Ser³⁰⁷ IRS-1.

Утицај хрома који је умешан у млеко у праху и даван мишевима КК соја је описан у истраживањима Chen и сарадника (2009). Овај сој мишева се генетски одликује инсулинском резистенцијом и гојазношћу и служи као модел систем инсулин независног типа 2 шећерне болести. Додати хром је у овој студији стимулисао активност АКТ (Thr³⁰⁸ и Ser⁴⁷³) и p85 α регулаторну субјединицу PI3K.

У *in vitro* студији Yang и сарадника (2005), синтетисан комплекс хрома са фенилаланином је у ћелији која је претходно стимулисана инсулином поспешао улазак глукозе у култури мишићних 3Т3-ћелија масног ткива. Овај процес је био праћен појачаним фосфорилацијама АКТ. Без претходне стимулације ћелије инсулином комплекс хрома није имао утицај на фосфорилације АКТ.

2.3.4.3. Улога хрома у активацији транслокације транспортног протеина за глукозу (GLUT4)

Утицај који хром има на унутарћелијски сигнални пут инсулина, доводи до појачане транслокације GLUT4 у ћелијску мембрану чиме је омогућен улазак глукозе у мишићно и масно ткиво. Новија *in vitro* истраживања (Pattar и сар., 2006 и Chen и сар., 2006) указују да хром појачава флуидност мембране смањењем количине холестерола у мембрани ћелије, олакшавајући на тај начин транслокацију GLUT4.



Слика 3. Претпостављени механизми путем којих хром утиче на сигнални пут инсулина као и на повећање садржаја глукозе у ћелији (преузето и прилагођено из рада Ниа и сар., 2012). Објашњење могућих места деловања хрома на инсулински сигнални пут дати су у тексту

2.3.5. Утицај хрома на модулирање метаболичких путева код крава

Након утврђивања неопходности хрома као микроелемента у исхрани лабораторијских глодара и потврде есенцијалности додавања хрома у растворе за парентералну исхрану људи (Jeejeebhoy и сар., 1977), деведесетих година почињу значајнија и свеобухватнија истраживања улоге хрома код домаћих животиња под претпоставком да би додавање хрома у оброк могло имати корисне ефекте за здравље животиња као и за побољшање производних и репродуктивних особина и да ће позитивно утицати на квалитет производа добијених од животиња (Spears, 1999). Неопходност додавања хрома је утврђена код бројних врста домаћих животиња: крава, свиња, оваца, коза, коња, кунића и живине (Amoikon и сар., 1995, Petterson, 2000, Van de Ligt и сар., 2002, Vincent, 2004).

У истраживањима на лабораторијским пацовима је утврђено да стрес повећава уринарни губитак хрома (Spears и Trivedi, 2013), али и да фетус, поготову током трећег триместра гравидитета, акумулира сопствене резерве хрома, чиме се смањује количина

хрома у ткивима мајке (Anderson, 1987). Полазећи од ових чињеница које су проучене код лабораторијских животиња претпоставило се да би додавање хрома током перипарталног периода, који за животињу представља извор стреса и када краве у значајној количини губе хром (путем урина услед стреса или због стварања деопа хрома код плода), могло да има позитиван утицај на саме животиње кроз побољшање ендокрино-метаболичког система.

Последњих година у литератури се појављују бројна истраживања улоге хрома код крава (McNamara и Valdez, 2005, Pechova и Pavlata, 2007, Soltan, 2010, Nikkha и сар., 2011, Kafilzadeh и сар., 2012, Amata, 2013, Leiva и сар., 2015).

Велики број суплемената хрома је коришћен у студијама на преживарима: хром-метионин, хром-никотинат, хром-пропионат, хром-пиколинат, хром-аминокиселински хелат, и хром органски везан у квасцу (Hayirli и сар., 2001, McNamara и Valdez, 2005, Pechova и Pavlata, 2007, Lloyd и сар., 2010, Targhibi и сар., 2011). Подаци објављени у досадашњој литератури указују да је хром органски везан у квасцу један од најбољих носилаца хрома (Liu и Yang, 2005). До сада нису утврђене поуздане вредности у количини хрома коју би требало додати у оброк код крава, а главни проблем за давање препорука представља немогућност адекватног мерења његове концентрације у организму (Mertz, 1974). Иако постоји реална потреба за додавањем хрома у стандардну исхрану крава у лактацији, пракса додавања хрома код фармских животиња није дозвољена према садашњим законима Европске Уније (RegEC, No 1831/2003).

У различитим истраживањима везаним за улогу хрома у исхрани крава током перипарталног периода добијени су контрадикторни резултати, што би се могло објаснити коришћењем различитих облика и једињења хрома, разликама у начину исхране крава, концентрацијама додатог хрома, као и различитом дужином давања хрома.

Наиме, у појединим студијама McNamara и Valdez (2005) суплементација крава хромом је трајала од 21. дана препартално до 35. дана пост партално. Hayirli и сарадници (2001) и Smith и сарадници (2005) и Sadri (2009) су хром додали од 21. дана препартално до 28. дана постпартално. Yasui и сарадници (2014) и Khalili и

сарадници (2012) су хром додавали од 21. дан препартално до 63. дана постпартално. У истраживањима Hayirli и сарадника 2001 и Sadri и сарадника (2009) коришћен је хром-метионин; Kegley и сарадници (1996) су користили хром-никотинат; Spears и сарадници (2012), Sumner и сарадници (2007), McNamara и Valdez (2005) и Rockwell и Allen (2016) хром-пропионат; Bunting и сарадници (1994), Besong и сарадници 1996 An-Qiang и сарадници (2009) хром-пиколинат; Wright и сарадници (1994) Subiyatno и сарадници (1996), Terramoccia и сарадници (2005) хром-аминокиселински хелат, хром органски везан у квасцу је коришћен у истраживањима Moonsie-Shageer и Mowat (1993), Chang и сарадника (1995), као и у истраживањима Pechova и Pavlata (2007).

Суплементација хромом пореклом из органских извора, указала је да он смањује инсулинску резистенцију ткива код различитих животињских врста укључујући и говеда у транзиционом периоду када се животиње налазе у NEB (Subiyatno и сар., 1996, Hayirli и сар., 2001, Sumner и сар., 2007, Spears и сар., 2012, Leiva и сар., 2017). Бројна истраживања изведена код преживара (Bunting и сар., 1994, DePew и сар., 1998, Hayirli и сар., 2001, Nikkha и сар., 2011, Spears, 2012, Kafilzadeh и сар., 2012) указују да хром утиче на метаболизам липида, у смислу смањења концентрације NEFA и холестерола, односно на начин који је сличан ономе код лабораторијских глодара и људи (Sahin и сар., 2007, Offenbacher и сар., 1980). Villalobos и сарадници (1997) су код крава које су добијале хром пиколинат, забележили смањење учесталости задржавања постељице након тељења са 56 %, колико је утврђено код контролне групе, на 16 % колико је утврђено код групе којој је апликован хром.

Бројне студије су указале на повећање млечности (Smith, 2005, McNamara и Valdez, 2005, Kafilzadeh и сар., 2012) код крава којима је додат хром у оброк. Међутим, друге студије нису успеле да покажу такав одговор организма (Bryan и сар., 2004, Nikkha и сар., 2011). Неколико аутора је утврдило смањену стресну реакцију код крава које су храњене хромом, што се огледало кроз смањење концентрације серумског кортизола у циркулацији (Chang и Mowat, 1992, Soltan и сар., 2012).

3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ ИСТРАЖИВАЊА

Циљ истраживања у оквиру ове докторске дисертације је био да се испита утицај пероралне апликације хрома (органиски тровалентни хром везан у квасцу) на активност инсулинске осовине код крава током перипарталног периода, као и његов утицај на млечност током ране лактације. Очекивало се да ће добијени резултати детаљније разјаснити метаболичку улогу хрома код крава, узимајући у обзир његову улогу у повећању активности инсулина која се одиграва након трансформације апликованог хрома у физиолошки активан молекул назван фактор толеранције глукозе (GTF-glucose tolerance factor).

Како би се постигао циљ, постављени су следећи истраживачки задаци:

- (1) третирати краве (од прве до четврте лактације) органиским препаратом тровалентног хрома везаног у квасцу (Co-Factor III Cr Yeast, *Alltech*). Доза хрома према препоруци произвођача и на основу литературних података по просечном грлу је 10 mg, односно 5 g препарата са органиски везаним хромом (0,2 % Cr³⁺ у препарату Co-Factor III Cr Yeast) који је свакодневно даван огледној групи крава у периоду од 25. дана пре очекиваног термина тељења до 30. дана после тељења, употребом езофагеалне тубе;
- (2) Узорке мишићног и масног ткива узимати 30. дана (пре апликације хрома) и 10. дана пре очекиваног термина тељења, а затим 7 и 28 дана након тељења, а узорке јетре узимати 10 дана пре очекиваног термина тељења као и 7 дана после тељења методом перкутане биопсије;
- (3) У узорцима ткива јетре, мишићног и масног ткива *Western blot* методом испитати заступљености протеина инсулинског рецептора (IR β), протеина супстрата инсулинског рецептора фосфорилисаног на Ser³⁰⁷ (pIRS-1 Ser³⁰⁷) и протеин киназе Б фосфорилисане на Ser⁴⁷³ (pAKT Ser⁴⁷³), односно заступљеност протеина GLUT4 само у мишићном и масном ткиву, где су и присутни;
- (4) Испитати функционално стање и одговор β ћелија панкреаса праћењем динамике кретања концентрације глукозе и инсулина у интравенском тесту

оптерећења глюкозом (*IVGTT-intravenous glucose tolerance test*) који ће се током трајања огледа изводити четири пута и то 28. и 7. дана пре очекиваног термина тељења као и 10. и 30. дана после тељења;

(5) Поред одређивања концентрација инсулина и глюкозе у свим узорцима крви добијеним током IVGTT, одредити концентрације кортизола и одређених биохемијских параметара крви (NEFA, ВНВА, укупних протеина, албумина, урее, укупног билирубина (ТВ), Са, Р, Mg, холестерола, TG, као и активности AST и GGT у нултим узорцима крвног серума добијеним непосредно пре извођења IVGTT;

(6) Израчунати вредност RQUICKY (*Revised quantitative insulin sensitivity check index*) као математичког показатеља инсулинске резистениције код крава;

(7) Оценити телесну кондицију (*BCS-body condition score*) 30. и 10. дана пре очекиваног термина тељења као и 7. и 28. дана после тељења, као и унос суве материје (*DMI- dry matter intake*) 4. и 1. недеље пре очекиваног термина тељења и 1. и 4. недеље после тељења;

(8) Пратити млечност крава од 1. до 14. недеље лактације и сакупити репрезентативне узорке млека 7. и 28. дана лактације за утврђивање састава млека (процента млечне масти, протеина и лактозе) и за израчунавање ЕСМ (*energy corrected milk yield*).

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

4.1. Место истраживања

Експериментални део истраживања на животињама је спроведен на фарми „Младост“ („ПКБ“ корпорација, Јабучки рит). Лабораторијска истраживања узетих узорака крви и биопсија јетре, мишића и масног ткива су спроведена на Факултету ветеринарске медицине Универзитета у Београду и на Институту за нуклеарне науке „Винча“ у Лабораторији за молекуларну биологију и ендокринологију и у Лабораторији за радиоизотопе.

4.2. Огледне животиње и њихов третман

Тридесет дана пре очекиваног термина тељења, који је одређен на основу датума осемењавања, краве холштајн расе старости од 4 до 6 година у касној фази гравидитета су подељене у две групе и то контролну (-Cr, n=10) и огледну (+Cr, n=10) које су обележене и смештене у посебан објекат везаног система држања у коме се свакодневно пратило њихово здравствено стање. Обе групе су током извођења експеримента добијале потпуно измешани оброк два пута дневно, при чему су састав и количина obroка били усклађени са потребама за дату фазу производно-репродуктивног циклуса крива. Састав и нутритивна вредност obroка су приказани у табели 1.

Табела 1. Врста и количина хранива у оброку испитиваних крава

Састав хранива	Касније фазе лактације	Засушење	Лактација
Силажа кукуруза(g/kg s.m.)	517	496	302
Силажа трава (g/kg s.m.)		79	175
Слама (g/kg s.m.)	212	190	
Сено (g/kg s.m.)	114		124
Пивски квасац (g/kg s.m.)			47
Млевени кукуруз(g/kg s.m.)	22	34	87
Пшеница (g/kg s.m.)	22	34	50
Јечам (g/kg s.m.)	22	34	53
Сунцокрет (g/kg s.m.)	38	36	
Соја у зрну (g/kg s.m.)	43	48	40
Сојино брашно (g/kg s.m.)			45
Пулпа сушене репе(g/kg s.m.)		18	51
Минерали (g/kg s.m.)	10	19	14
Пропилен гликоЛ(g/kg s.m.)		12	12
Сирови протеин (g/kg s.m.)	126	138	161
Сирова маст (g/kg s.m.)	31	28	21
NEL, MJ/kg s.m.	5,7	6,7	7,3
ADF, g/kg s.m.	270	241	22
NDF, g/kg s.m.	438	37	358

Прва -Cr група крава (n=10) није добијала препарат органског комплекса тровалентног хрома везаног у квасцу (Co-Factor III Cr Yeast, *Alltech*), док је друга, +Cr група крава (n=10) у периоду од 25. дана пре очекиваног термина тељења до 30. дана после тељења свакодневно перорално болусом, уз јутарњи оброк, употребом езофагеалне тубе добијала 10 mg, односно 5 g препарата са органски везаним хромом (0,2 % Cr³⁺ у препарату Co-Factor III Cr Yeast). Доза хрома је одређена према препоруци произвођача и на основу литературних података по просечном грлу.

Реализацију истраживања је одобрила Етичка комисија за добробит животиња Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду, у складу са одредбама Закона о добробити животиња Републике Србије (Службени гласник Републике Србије број 41/09), Закона о научно-истраживачкој делатности Републике Србије

(Службени гласник 110/2005 и 50/2006), Закона о ветеринарству (Службени гласник (91/2005) и Европске конвенције о заштити кичмењака који се користе за огледне и друге научне сврхе ЕТС 123, 1986).

4.3. Методе рада

4.3.1. Узимање узорака крви

Непосредно пре извођења тестова оптерећења глукозом узети су узорци крвипункцијом *v. jugularis* за биохемијске анализе свих 20 крава укључених у истраживање.

Узорци крви су узимани у стерилне вакутајнер епрувете без антикоагуланса. Након узимања, узорци крви су обележавани и остављани да спонтано коагулишу током 30 минута, а затим центрифугирани на 1000 x g током 20 минута.

Издвојени узорци крвног серума су паковани у трипликату у количини од 1,5 ml у епендорфима који су обележавани на одговарајући начин и замрзавани на -20 °C до извођења анализа, које су изведене у року од два месеца од узорковања крви.

4.3.2. Интравенски тестови оптерећења глукозом (IVGTT)

IVGTT је урађен на укупно 12 крава (n=6 крава по групи) четири пута током испитиваног периода и то 28. и 7. дана пре очекиваног термина тељења као и 10. и 30. дана после тељења, непосредно након узорковања крви за биохемијске анализе.

Тестови оптерећења су увек извођени у истом периоду дана и то 4 сата после давања јутарњег оброка, како би се избегао утицај дневног ритма и узимање оброка на резултате анализа. За време извођења тестова оптерећења избегавана је груба манипулација са животињама како би се умањио ефекат стреса.

IVGTT је заснован на давању глукозе болус инфузијом и узорковањем крви у кратким временским интервалима у циљу регистровања хипергликемије, хиперинсулинемије и промена у концентрацији NEFA у крви. Тестови оптерећења глукозом су изведени апликацијом 500 mg/kg телесне масе 50 % раствором глукозе

(глукоза 2,78 mol/L wt/vol, "Zorka farma", Шабац"), инфузијом у *v. jugularis* у трајању 5-7 минута, док су узорци крви узимани из истоимене вене на супротној страни врата.

Непосредно пре давања 50 % раствора глукозе (0. минут) узоркована је крв, а накнадни узорци крви су узимани 15., 30., 60., 90. и 120. минута након давања глукозе.

Концентрације глукозе и инсулина су одређене у свим узорцима, док су концентрације NEFA одређене само у нултим узорцима.

4.3.3. Узимање узорака ткива јетре

Узорци јетре су узимани десет дана пре очекиваног термина тељења као и седам дана после тељења перкутаном биопсијом помоћу модификованог биопсера за узимање ткива јетре по методи коју су описали Шаманц и сар., (2010). Биопсер се састојао од игле дугачке 205 mm и широке 2,5 mm са заостреним врхом, уметнуте у челичну канилу (спољашњи промер \varnothing 6 mm, а унутрашњи \varnothing 4 mm). Прибор за биопсију се састојао још и од маказа, раствора повидон јодида, прокаин-хидрохлорида (2 % раствор), бријача, скапела, пластичне бризгалице са клипом и антибиотског спреја.

Место за узимање узорака биопсије јетре је зид десне стране грудног коша на стојећој животињи у пределу између 11. и 12. ребра у нивоу замишљене линије седне кврге-*tuber ischii* на десној страни и супротног лакта, односно благо кранијално и вентрално.

Површина поља за биопсију која је износила 5x5 cm, је најпре ошишана, затим обријана, асептички припремљена повидон јодидом, а затим је субкутано дата локална инфилтративна анестезија 2 % раствора прокаин-хидрохлорида у количини од 5 ml по животињи. Скапелом је направљен мали, убодни, рез коже и поткожног ткива да би се убацио биопсер, а онда је уз употребу снажног, али контролисаног притиска прободен међуребарни мишић, перитонеум и капсула јетре. Приликом увођења, биопсер је био усмерен према левом лакту тј. кранио-вентрално. Игла биопсера је извађена одмах након уласка биопсера у ткиво јетре, а на канилу је постављена пластична бризгалица која повлачењем клипа формира вакуум. Узорак ткива јетре

(дијаметра 3-4 mm и 3-5 mm дужине) је узет на тај начин што је истовремено са повлачењем клипа бризгалице, инструмент потискиван дубље у ткиво јетре уз ротацију од 180°, чиме је исечак ткива увучен у лумен каниле. Након вађења каниле са исечком ткива јетре, рана на кожи је третирана антибиотским спрејом.

Узорци јетре (приближно 500 mg по узорку) су одмах након узорковања постављени на чисти убрус како би упио вишак крви у циљу смањења контаминације узорка крвљу. Узорци су затим обележавани и дубоко замрзавани у течном азоту, а затим чувани на -80 °C до извођења анализа, одређивања експресије протеина укључених у инсулински сигнални пут: IR β , pIRS-1 Ser³⁰⁷, pAKT Ser⁴⁷³.

4.3.4. Узимање узорака мишићног и масног ткива

Узорци мишићног ткива су узети перкутаном биопсијом по методи коју су описали Al-Trad и сарадници (2009), док је биопсија масног ткива урађена по методи коју су описали Locher и сарадници (2011).

Биопсија узорака мишићног и масног ткива је урађена 30. и 10. дана пре очекиваног термина тељења као и 7. и 28. дана после тељења. Биопсије скелетних мишића су узете са *m. semitendinosus* коришћењем стерилне игле за биопсију \varnothing 8mm (Kruuse, Данска) у количини приближно 3 g по биопсији, под асептичним условима, након поткожне и интрамускуларне локалне инфилтративне анестезије 2 % раствора лидокаина у количини од 5 ml по животињи. Места биопсије мишића су одмах затворена коришћењем појединачног чворастог шава (Surgicryl 2-PGA, Белгија), и затим испрскана антибиотским спрејом у циљу спречавања настанка инфекције.

У циљу биопсије субкутаног масног ткива на кожи у регији корена репа је скалпелом направљен рез приближне величине 5cm, под асептичним условима после примене локалне инфилтративне анестезије 2 % раствора лидокаина у количини од 5 ml по животињи. Количина узорка је била од 3 до 5 g. Места биопсије субкутаног масног ткива су одмах затворена коришћењем појединачног чворастог шава, и затим испрскана антибиотским спрејом у циљу спречавања настанка инфекције.

Након узорковања са добијених узорка мишићног и масног ткива је уклоњено сувишно везивно ткиво и потом је добро испрано у хладном физиолошком раствору како би се смањила контаминација узорка крвљу.

По узимању узорака мишићног и масног ткива они су обележавани и дубоко замрзавани у течном азоту, а затим чувани на $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до извођења анализа, одређивања експресије протеина укључених у инсулински сигнални пут: IR β , pIRS-1 Ser³⁰⁷, pAKT Ser⁴⁷³, као и GLUT4.

4.3.5. Одређивање концентрације биохемијских параметара крви

У узорцима крви свих животиња одређене су концентрације ВНВА, NEFA, укупног билирубина (ТВ), укупних протеина, албумина, урее, Mg, Ca, P, холестерола, TG и активности аспартат аминотрансферазе (AST) и гама глутамил трансфераза (GGT).

Концентрације глукозе су одређене после ензимске оксидације глукозе помоћу глукоза оксидазе. Концентрације ВНВА су одређене кинетичком ензимском методом. Концентрације NEFA су одређене ензимско-колориметријском методом. Концентрације ТВ су одређене модификованом Jendrassik методом заснованом на реакцији билирубина са диазотованом сулфанилном киселином. Концентрације укупних протеина су одређене колориметријском методом биуретским реагенсом. Концентрације албумина су одређене колориметријском методом на основу везивања бромокрезол зеленог. Концентрације урее су одређене ензимским UV тестом користећи уреазу и глутамат дехидрогеназу. Концентрације P су одређене колориметријским мерењем нередукованог фосфолибдата. Концентрације Mg су одређене колориметријском методом заснованом на реакцији ксилидил плаве. Концентрације холестерола су одређене коришћењем ензимске колориметријске методе. Концентрације TG су одређене колориметријском методом у присуству глицерол фосфат оксидазе. Активности AST су одређене UV-кинетичком методом на основу стопе NADH оксидације у спојеној реакцији малат дехидрогеназе. Активност гама глутамил трансфераза (GGT) је одређена колориметријском методом.

Концентрације глукозе, ВНВА, NEFA, ТВ и урее, као и активност GGT су мерени коришћењем комерцијалних дијагностичких китова Randox, Crumlin (Велика Британија). Концентрације укупних протеина, албумина и Р, као и активност AST су одређене комерцијалним дијагностичким китом Spinreact (Шпанија). Концентрације Са су мерене комерцијалним дијагностичким китом Clinichem (Мађарска). Концентрације Mg, TG и холестерола су измерене комерцијалним дијагностичким китом Pointe scientific (SAD).

Сви биохемијски параметри измерени у крвном серуму су одређени на полуаутоматском биохемијском анализатору STAT FAX 3300 AVRENESS TECHNOLOGY INC (SAD).

4.3.6. Одређивање концентрације хормона

У оквиру истраживања одређене су концентрације инсулина и кортизола.

4.3.6.1. Одређивање концентрације инсулина

Концентрација инсулина је одређена код 20 крава (n=10 по групи) као и 15, 30, 60, 90. и 120. минута у току IVGTT код укупно 12 крава (n=6 по групи).

Одређивање концентрације инсулина у серуму је вршено помоћу RIA методе. Принцип методе се заснива на компетитивном везивању инсулина из узорка и радиоактивно обележеног инсулина (^{125}I -инсулин) за одређени број епитопа на специфичним анти-инсулин антителима, при чему настају обележени и необележени имунокомплекси. Обележеног комплекса се формира утолико мање уколико има више инсулина у узорку. После инкубације узорка са обележеним инсулином и антителима током 20h на собној температури настали комплекси су таложени имуноадсорбентом који представља комбинацију секундарних антитела и полиетиленгликола PEG (инкубација 30 min на собној температури) након чега су центрифугирани у току 25 min на 3000 x g. У течной фази заостају слободни инсулин и слободна антитела, док се у талогу налазе комплекси антитела са обележеним инсулином или инсулином из узорка. Радиоактивност талога је мерена током једног минута гама бројачем Compu

Gamma 1282 (LKB, Turku, Финска). Концентрација инсулина је одређена са стандардне криве, која је формирана третирањем стандарда који садрже различите прецизно дефинисане концентрације инсулина (3, 10, 30, 100 и 300 mIU insulina/L). Сензитивност есеја је 0,60 mIU/L, а унутрашњи коефицијент варијације у есеју износи 5,24 %.

4.3.6.2. Одређивање концентрације кортизола у узорку

Концентрација кортизола је одређена код укупно 20 крава (n=10 по групи). Тест се заснива на принципу компетитивног везивања серумског кортизола и радиоактивно обележеног кортизола (¹²⁵I-кортизол) за мали, али одређени број епитопа на специфичним анти-кортизол антителима, при чему се формирају обележени и необележени имунокомплекси. Антитела високог афинитета према кортизолу су имобилисана на површини полипропиленских тест-епрувета. Уколико је већа концентрација кортизола у серуму формираће се мање обележеног комплекса, након инкубације од 3 h у воденом купатилу на температури од 35 до 39 °C. После завршене реакције сви настали комплекси остају везани за чврсту фазу (тест-епрувету), док слободни кортизол (обележени и необележени) остаје у течној фази. Радиоактивност епрувета је мерена током једног минута гама бројачем Compu Gamma 1282 (LKB, Turku, Финска). Концентрација кортизола у серуму је одређена упоређивањем са стандардном кривом, која је формирана третирањем стандарда који садрже различите прецизно дефинисане концентрације кортизола (25, 60, 200, 400, 1200 nmol/l). Сензитивност есеја је 2,171 nmol/L, а унутрашњи коефицијент варијације у есеју износи 2,7191 %.

4.3.7. Припрема ћелијског лизата мишићног и масног ткива и јетре

Све фазе припреме ткива су рађене на леду (4 °C). Узорци мишићног ткива и јетре су прво уситњени маказама, а затим хомогенизовани уз додатак модификованог RIPA- пуфера за лизирање (pH 7,4) који је садржао 50 mM/L Tris-HCl pH 7,4, 150 mM/L NaCl, 1 mM/L EDTA, 0,2 % SDS, 1 % TritonX-100, 0,2 % натријум деоксихолат, протеазне инхибиторе (2 mM PMSF, 10 µg/ml леупептин и 10 µg/ml апротинин), фосфатазне инхибиторе (100 mM NaF, 10 mM натријум пиродифосфати 2 mM натријум ортованадат) у односу 1:4 (m:V) у стакленим киветама типа Correx, на UltraTurrex хомогенизеру, 3 x 60 s са паузама од 60 s. Настали хомогенат мишићног ткива и јетре је центрифугиран 30 min на 15000 x g на 4 °C.

Узорци масног ткива су након уситњавања хомогенизовани на леду у стакло-тефлон хомогенизеру са додатком модификованог RIPA- пуфера за лизирање у односу 1:2 (m:V) са 6-8 завеслаја.

Хомогенат масног ткива је центрифугиран на 3000 x g на 4 °C 15 минута, а затим је добијени интернатант центрифугиран 30 минута на 15000 x g на 4 °C да би се уклонили липиди и делови ћелија који нису растворени детергентом.

У добијеним супернатантима који представљају укупни лизат ћелија мишићног и субкутаног масног ткива одређивана је концентрација протеина помоћу BCA (Pierce, Rockford, IL, USA) методе. Након тога узорци ћелијског лизата су припремљени за Western blot анализу тако што су разблаживани до концентрације 10 mg/ml додавањем модификованог RIPA пуфера и затим до финалних 5 mg/ml додавањем исте запремине (1:1) Laemmli пуфера (100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 200 mM DTT или β меркаптоетанола, 4 % SDS, 0,2 % бром фенол плаво и 20 % глицерол) (Laemmli, 1970). Узорци су затим 5 минута излагани температури од 100 °C, а након хлађења на собној температури су замрзнути на -20 °C до коришћења за Western blot анализу.

4.4. Одређивање концентрације протеина у лизату ВСА методом

Концентрација протеина у узорцима јетре, мишићног и масног ткива је одређивана ВСА методом (BCA protein assay reagent, Pierce, Rockford, IL, USA), употребом комерцијалног дијагностичког комплета према препоруци произвођача (Smith, 1985). Овај реагенс је у форми натријумове соли сензитиван, стабилан и високо специфичан агенс за јоне бакра Cu^{1+} . Пептидне везе и четири аминокиселине (цистеин, цистин, триптофан и тирозин) су одговорне за развијање боје у протеинским узорцима који су инкубирани са ВСА. Ова метода представља комбинацију биуретске реакције која подразумева редукцију Cu^{2+} до Cu^{1+} протеинима у алкалној средини и високо сензитивне и селективне колориметријске детекције бакарних јона помоћу реагенса који садржи бицинхонинску киселину. Након комплексирања два молекула бицинхонинске киселине са једним Cu^{1+} јоном настаје хидросолубилан љубичасто обојен производ који апсорбује светлост на 562 nm, што омогућава спектрофотометријску квантификацију протеина у опсегу 20-2000 $\mu\text{g/ml}$. Концентрација укупних протеина је одређена са стандардне криве формиране на основу измерених вредности апсорбанци познатих растућих концентрација говеђег серумског албумина (0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 mg/ml).

4.5. Електрофореза на SDS полиакриламидном гелу (SDS-PAGE)

Ради анализе укупног садржаја протеина и фосфорилације молекула инсулинског сигналног пута, протеини из узорка укупног лизата ткива јетре, као и мишићног и субкутаног масног ткива су најпре раздвајани методом SDS електрофорезе на полиакриламидном гелу.

SDS електрофореза је метода раздвајања денатурираних протеина на основу разлика у њиховој релативној молекулској маси. Протеини су најпре загревањем и анјонским детергентом SDS превођени у линеарне полипептидне ланце јер долази до нарушавања њихове терцијарне структуре и маскирано наелектрисање које потиче од аминокиселинских остатака. Узорци укупног ћелијског лизата (75 μg протеина по

бунарићу) су наношени на 7,5 % или 10 % SDS полиакриламидни гел и раздвајани помоћу Mini Protean Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Електрофореза се одвијала првих 15 min на 150 V, а затим још 1h 30 min на 100 V. Маркер молекулских маса који је коришћен садржи протеине молекулских маса 250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10 kDa (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas, Vilnius, Lithuania).

4.5.1. Western blot

По завршетку електрофорезе извршен је трансфер протеина са полиакриламидног гела на PVDF мембрану (Milipore, Bedford, MA; SAD). PVDF мембрана је претходно активирана потапањем у 100 % метанол 15 s, затим 2 min у дестилованој води и на крају најмање 5 min у пуферу за трансфер. Трансфер протеина је рађен у пуферу за SDS PAGE (0,0025 M Tris pH 8,3, 0,192 M glicin и 0,1% SDS), са додатком метанола (20 %) преко ноћи на 4 °C, при константној јачини струје 80 mA у апарату за мокри трансфер (Trans-Blott Cell, Bio-Rad). После трансфера протеина са гела, мембране су инкубиране у пуферу за блокирање (5 % раствор BSA у TBST пуферу следећег састава: 25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween, pH 8,0) 1,5 h на собној температури у циљу смањења неспецифичног везивања антитела за мембрану, по истеку тог времена мембране су испране 2 x 10 min у TBST, а након тога мембране су преко ноћи инкубиране на 4 °C са примарним антителима на IR β , GLUT4, pIRS-1Ser³⁰⁷, pAKT Ser⁴⁷³ и β aktin у узорцима масног и мишићног ткива, док су у узорцима лизата јетре мембране инкубиране са примарним антителима на IR, pIRS-1 Ser³⁰⁷, pAKT Ser⁴⁷³ и β aktin, с обзиром на то да у јетри није засупљен протеин глукозни транспортер тип 4 (GLUT4). У Western blot анализи коришћена су следећа примарна антитела:

(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).

- зечије поликлонско анти IR β (s.c.-711)

- зечије поликлонско анти GLUT4 (s.c.-7938)

- зечије поликлонско anti-fosfo-pAKT Ser⁴⁷³ (s.c.-7985-R)

- зечије поликлонско анти β aktin (s.c.-1616-R)

-зечије поликлонско анти pIRS-1 Ser³⁰⁷ (ups. 07-247) Millipore, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA

Као секундарно антителио коришћено је анти-зечије IgG-HRP (s.c.-2004), конјуговано са пероксидазом из рена (HRP, енгл. *horse-radish peroxidase*, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).

Разблажења примарних антитела су прављена у TBST пуферу у односу 1:200; 1:500 и 1:1000. После инкубације са примарним антителима мембране су испирани 5x5 min у TBST пуферу. После тога мембране су инкубирани са секундарним анти-зечијим антителом конјугованим са HRP (разблажење 1:10000 TBST), 1,5 h на собној температури. Затим су мембране поново испране 5x5 min у TBST пуферу.

После испирања, мембране су инкубирани са одговарајућим супстратом који омогућава детекцију трака које потичу од жељеног протеина. Секундарна антителиа су била конјугована са HRP, а мембране су инкубирани у мраку 3 min са хемилуминисцентним супстратом (ECL, енгл. *enhanced chemiluminescence*) који настаје мешањем једнаке количине раствора који садржи луминол и раствора који садржи водоникпероксид. После тога мембране су у касети за развијање инкубирани 3 min са рендген филмом (ORTO CP-G-PLUS, AGFA) при чему интензитет сигнала на филму одговара количини протеина ког желимо да детектујемо у анализираним узорцима. Добијени резултати су анализирани дензитометријски коришћењем софтвера Image J (НИН-национални институт здравља; Bethesda, MD, USA).

После одређивања фосфо-форми анализираних молекула мембране су инкубирани у трајању од 30 min на 50 °C у пуферу за „стриповање“ (100 mM β -merkaptoetanol, 2 % SDS i 62,5 mM Tris pH 6,7), ради уклањања претходно везаног примарног антитела, секундарног антитела и супстрата који чини реакцију видљивом. Након тога мембране су испране 2 x 10 min у TBST пуферу и инкубирани у 5 % BSA и реблотовани са антителима на остале жељене молекуле инсулинског сигналног пута на које хром има утицаја.

У циљу контроле једнаког уноса протеина у свим узорцима ћелијског лизата, коришћено је анти-актин антитело на β aktin чија је количина у ћелијама константна и специфични сигнал за испитиване молекуле је била нормализован на актин.

4.6. Математички израчунати показатељи инсулинске резистенције

Да би се испитала инсулинска резистенција периферних ткива, коришћени су подаци добијени у IVGTT. За наш експеримент обрачунат је RQUICKI параметар (*Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*).

RQUICKI се користи у процени инсулинске резистенције употребом базалних вредности глукозе, инсулина и NEFA, као што су описали Holtenius и Holtenius (2007), према следећој формули:

$$RQUICKI = 1 / [\log \text{ глукоза (mg / dl) + log инсулин (iU / ml) + log NEFA (mmol/L)}].$$

Ниска вредност RQUICKI се може установити код гојазних животиња и показатељ је смањене осетљивости ткива на инсулин (Holtenius и Holtenius, 2007).

Кинетика глукозе током IVGTT утврђена је употребом следећих параметара: базална концентрација глукозе (T_{0glu}), степен опадања концентрације глукозе током теста (k), полувреме елиминације глукозе ($T_{1/2}$) и површина испод криве глукозе која је праћена од 0. до 120. минута (AUC_{glu}).

Кинетика инсулина током IVGTT утврђена је употребом следећих параметара: базална концентрација инсулина (T_{0ins}), највиша концентрација инсулина (Ins_{peak}), пораст инсулина (ΔMAX_{ins}) и површина испод криве инсулина током теста која је праћена од 0. до 120. минута (AUC_{ins}).

Базалне концентрације глукозе и инсулина одређиване су непосредно пре апликације болуса глукозе (нулти период). Степен опадања концентрације глукозе током теста (k вредност) је одређена из концентрације глукозе у крвном серуму 15. и 60. минута од интравенског давања глукозе, коришћењем модификоване формуле по Holtenius и сарадницима (2003).

$$k = [(\ln_{glucose} T_{15} - \ln_{glucose} T_{60}) / (T_{60} - T_{15})] * 100 (\% \text{ min}).$$

Полувреме елиминације егзогено унете глукозе ($T_{1/2}$) је добијено коришћењем следеће формуле ($T_{1/2}$) = 0,693/k * 100 (min).

Пораст инсулина (ΔMAX_{ins}) је израчунат као разлика између максималних и базалних концентрација инсулина.

AUC за инсулин и глукозу су процењени као интегрисано подручје (линеарни трапезоидални метод) испод криве концентрације глукозе и инсулина у серуму током целокупног (0.-120. минута) периода после давања глукозе коришћењем програма Origin 8.6 (OriginLab, SAD).

4.7. Млечност и анализе састава млека

После тељења краве су измузаване два пута дневно. Млечност је мерена једанпут недељно и одређивана је као просечна вредност четири узастопне муже, од прве до четрнаесте недеље лактације коришћењем опреме Milk master (DeLaval, Australia). Репрезентативни узорци млека су сакупљани прве и четврте недеље лактације када су узимани и узорци ткива. Узорци млека су чувани у калијум дихромату на 4 °C до извођења анализа састава млека: млечне масти, протеина и лактозе (LactoScope C4; Delta Instruments, the Netherlands).

4.8. Оцена телесне кондиције

Оцена телесне кондиције (коришћењем петостепене скале са кварталном поделом) је рађена индивидуално свакој животињи проценом телесних резерви у пределу корена репа, од стране исте особе коришћењем система који су описали Edmundson и сарадници (1989) и Ferguson и сарадници (1994) и који је описан у NRC (2001). Коришћена је скала од тачке 1 до тачке 5 са интервалима промена од 0,25, где 1 на скали представља мршаву краву, а 5 веома дебелу краву. Пожељном BCS на почетку лактације се сматра вредност између 3,25 и 4,25. Оцена телесне кондиције је мерена 30. и 10. дана пре очекиваног термина тељења као и 7. и 28. дана после тељења. Губитак телесне кондиције од термина тељења до краја NEB обично је у опсегу између 0,5 и 1 (јединице). Губитак једне јединице телесног индекса се процењује као губитак

7 до 8 % телесне масе животиње и обезбеђује оквирно 417 MCal нето енергије (NRC, 2001, Oikawa и Oetzel., 2006).

4.9. Статистичке анализе

Статистичка обрада података је извршена употребом софтверског пакета STATISTICA v.8 (StatSoft, Tulsa, Ok, SAD). Сви резултати су представљени табеларно или графички коришћењем параметара дескриптивне статистике: средња вредност \pm стандардна грешка средње вредности. Значајност разлике између просечне концентрације је процењивана коришћењем two-way ANOVA теста са две варијабле (третман и време). One way ANOVA је коришћена да би се проценила за параметре који су мерени само два пута током извођења експеримента и за млечност. Разлике су сматране значајним на $p < 0,05$, $p < 0,01$ и $p < 0,001$, појединачно. Осим разлика које су статистички значајне, разлике које су показивале тенденцију промена одређених параметара ($0,05 < p < 0,10$) су такође приказане. Легенде испод сваке слике и табеле укључују детаљан опис ознака које су коришћене као показивачи статистичке значајности.

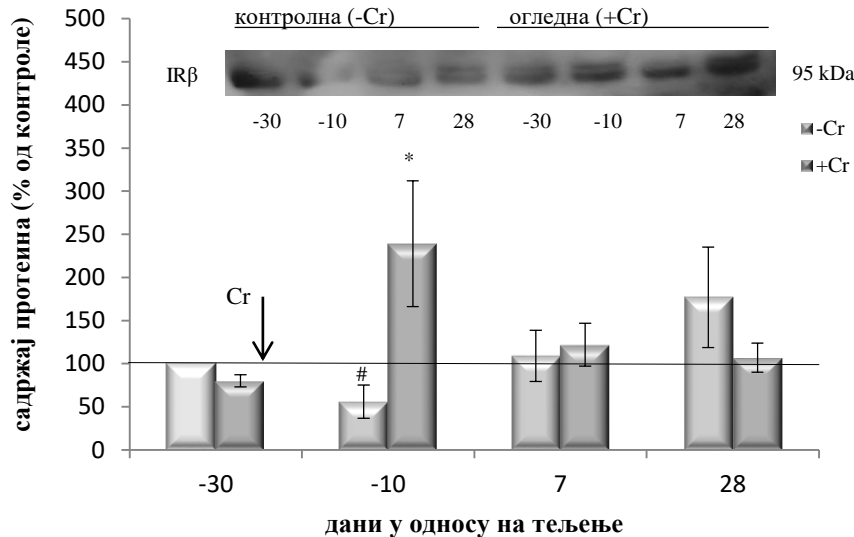
5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

На основу литературних података проистеклих из изучавања на другим животињским врстама третман хромом би требало да побољша инсулинску сензитивност ткива, а обзиром на то да су механизми деловања хрома на инсулински сигнални пут код крава још увек непознаница било је занимљиво проверити какве ефекте показује хром на молекуле инсулинског сигналног пута у инсулин сензитивним ткивима (мишићном и масном) као и у јетри крава. Претпоставили смо да би истраживање молекуларних механизма могло да допринесе правилном одређивању потреба за хромом код ове животињске врсте, обзиром да NRC (2001) није дало препоруке за унос хрома за преживаре, као што је то урадио Институт за медицину (2001) за људску популацију.

5.1. Заступљеност протеина инсулинског сигналног пута у мишићном ткиву

5.1.1. Заступљеност протеина IR β у мишићном ткиву

На слици 4 приказана је заступљеност протеина IR у мишићном ткиву у свим периодима испитивања, и то у виду хистограма и репрезентативног Western blota.



Слика 4. Заступљеност протеина IR β код контролних (-Cr) и огледних крава (+Cr) у мишићном ткиву током перипарталног периода

Репрезентативни имуноблотови су приказани на врху слике, а квантификација заступљености IR β у огледној групи представљена је као проценат одговарајуће контроле, док је у контролној групи крва квантификација изведена као проценат између контролне групе у датом периоду испитивања и јединствене контроле -30 дана пре очекиваног термина тељења. Резултати су представљени као средња вредност \pm S.E.

Тумачење: Хистограми представљају заступљеност IR β код огледне групе, изражену процентуално у односу на одговарајућу контролу (код које је заступљеност рецептора сведена на вредност од 100%). \downarrow Стрелица означава време почетка апликације хрома. * - указује на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између контролне и огледне групе у датом времену испитивања; # - указује на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између контролне групе у датом времену испитивања и јединствене контроле -30Cr-

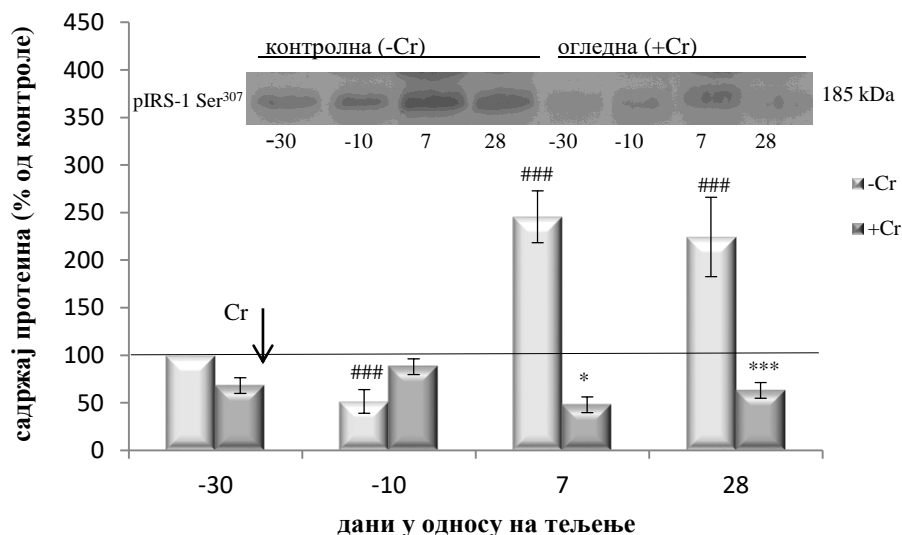
Са слике 4 се запажа да је пре апликације хрома заступљеност IR β била нижа код огледне групе (80 %) у односу на контролну групу (100 %), али разлика није била статистички значајна ($p=0,07$). Добијени резултати анализе ефекта хрома у мишићима показују да је протеински садржај IR β , 10 дана пре очекиваног термина тељења, код огледне групе крва значајно повећан (239 %) у односу на контролну групу код које је заступљеност била 56 % ($p=0,04$). Седам дана после тељења заступљеност протеина IR β је и даље била већа код огледне групе (122 %), док је код контролне групе износила

109 %, и утврђена разлика није била статистички значајна ($p=0,23$). Последњег дана апликације хрома, односно 28. дана после тељења, заступљеност протеина IR β је била виша код контролне (177 %) у односу на огледну групу(107 %), али разлика није била статистички значајна ($p=0,59$).

Експресија IR β у мишићима је значајно смањена ($p<0,05$) у контролној групи крава 10. у односу на 30. дан пре очекиваног термина тељења.

5.1.2. Заступљеност протеина pIRS-1Ser³⁰⁷ у мишићном ткиву

На слици 5 приказана је заступљеност протеина pIRS-1Ser³⁰⁷ у мишићном ткиву у свим периодима испитивања, и то у виду хистограма и репрезентативног Western blota.



Слика 5. Протеински садржај pIRS-1 Ser³⁰⁷ код контролних (-Cr) и огледних крава (+Cr) у мишићном ткиву током перипарталног периода

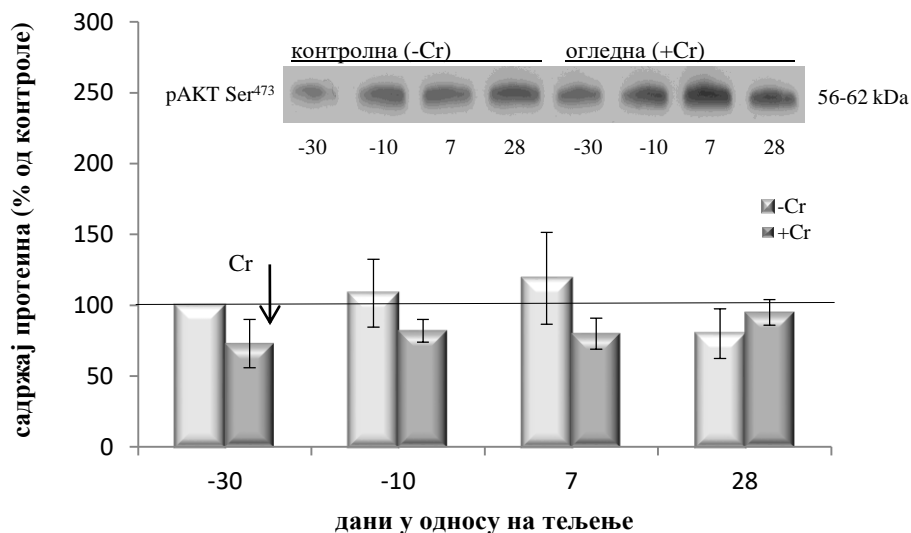
Репрезентативни имуноблотови су приказани на врху слике, а квантификација заступљености pIRS-1 Ser³⁰⁷ у огледној групи представљена као проценат одговарајуће контроле, док је у контролној групи крава квантификација изведена као проценат између контролне групе у датом периоду испитивања и јединствене контроле -30 дана пре очекиваног термина тељења. Резултати су представљени као средња вредност \pm S.E.

Тумачење: Хистограми представљају заступљеност pIRS-1 Ser³⁰⁷ код огледне групе, изражену процентуално у односу на одговарајућу контролу (код које је заступљеност pIRS-1 Ser³⁰⁷ сведена на вредност од 100 %). ↓ Стрелица означава време почетка апликације хрома. *- указује на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између контролне и огледне групе у датом времену испитивања; ***- указује на статистички значајну разлику ($p < 0,001$) између контролне и огледне групе у датом времену испитивања; ###- указује на статистички значајну разлику ($p < 0,001$) између контролне групе у датом времену испитивања и јединствене контроле -30Cr-

Резултат добијен одређивањем присуства pIRS-1 Ser³⁰⁷ у мишићном ткиву 5 дана пре апликације хрома показују да је заступљеност фосфо форме протеина директног супстрата рецептора за инсулин био нижи у огледној групи (68 %), у поређењу са одговарајућом контролом, али статистички значајне промене нису запажене ($p = 0,13$). У периоду 10 дана пре очекиваног термина тељења, заступљеност протеина је била већа у огледној групи (88 %), у поређењу са контролном (51,31 %), али изостала је статистичка значајност разлике ($p = 0,30$). Резултати добијени анализом заступљености протеина pIRS-1 Ser³⁰⁷ у мишићима у оба испитивана периода након тељења показују да третман хромом значајно мења заступљеност протеина pIRS-1 Ser³⁰⁷, с обзиром на то да је био значајно нижи у огледној (48 %, $p < 0,05$ и 63 %, $p < 0,001$, појединачно), него у контролној групи, као и да је значајно промењен током времена у контролној групи. Наиме, код контролне групе крава у периоду 10 дана пре очекиваног термина тељења забележено је статистички значајно смањење заступљености pIRS-1 Ser³⁰⁷ (51,31 %, $p = 0,0001$) у поређењу са периодом 30 дана пре очекиваног термина тељења. Након тељења у контролној групи крава статистички се значајно повећава заступљеност pIRS-1 Ser³⁰⁷ и то 245,54 % ($p < 0,001$) и 224,26 % ($p < 0,001$).

5.1.3. Заступљеност протеина pAKT Ser⁴⁷³ у мишићном ткиву

На слици 6 приказана је заступљеност протеина pAKT Ser⁴⁷³ у мишићном ткиву у свим периодима испитивања, и то у виду хистограма и репрезентативног Western blota.



Слика 6. Протеински садржај рАКТ Ser⁴⁷³ код контролних (-Cr) и огледних крава (+Cr) у мишићном ткиву током перипарталног периода

Репрезентативни имуноблотови су приказани на врху слике, а квантификација заступљености рАКТ Ser⁴⁷³ у огледној групи представљена је као проценат одговарајуће контроле, док је у контролној групи крава квантификација изведена као проценат између контролне групе у датом периоду испитивања и јединствене контроле -30 дана пре очекиваног термина тељења. Резултати су представљени као средња вредност \pm S.E

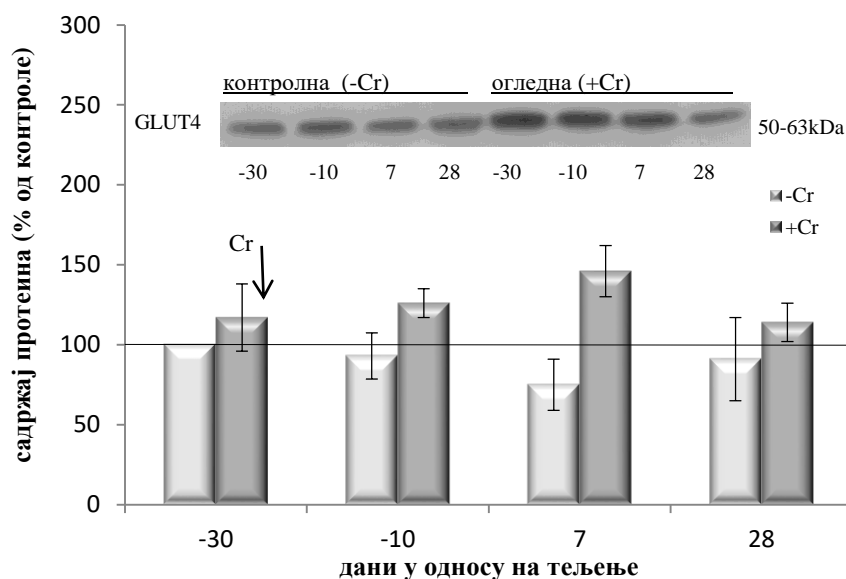
Тумачење: Хистограми представљају заступљеност рАКТ Ser⁴⁷³ код огледне групе, изражену процентуално у односу на одговарајућу контролу (код које је заступљеност рАКТ Ser⁴⁷³ сведена на вредност од 100%). ↓ Стрелица означава време почетка апликације хрома

Експериментални резултати добијени анализом заступљености протеина показују да је експресија молекула рАКТ Ser⁴⁷³ у мишићима пре апликације хрома била нижа у огледној групи (73 %), али није била утврђена значајност разлика између група ($p=0,24$). Током периода 10 дана пре очекиваног термина тељења заступљеност протеина рАКТ Ser⁴⁷³ је била нижа, али не статистички значајно, у огледној групи (82 %, $p=0,07$) у поређењу са контролом (108 %). Седам дана после тељења у огледној групи заступљеност протеина је била 80 %, а у контролној нешто виша 119 %, али није била утврђена значајност разлика између група ($p=0,51$).

У периоду 28. дана после тељења заступљеност протеина pAKT Ser⁴⁷³ у мишићима се повећавао 95 %, али статистичка значајност разлика није утврђена. Код контролне групе крва експресија молекула pAKT Ser⁴⁷³ је била највиша у периоду 7. дана после тељења (119 %), а најнижа 28. дана после тељења (80 %). Статистичка значајност разлика није утврђена.

5.1.4. Заступљеност протеина GLUT4 у мишићном ткиву

На слици 7 приказана је заступљеност протеина GLUT4 у мишићном ткиву у свим периодима испитивања, и то у виду хистограма и репрезентативног Western blota.



Слика 7. Заступљеност протеина GLUT4 код контролних (-Cr) и огледних крва (+Cr) у мишићном ткиву током перипарталног периода

Репрезентативни имуноблотови су приказани на врху слике, а квантификација заступљености GLUT4 у огледној групи представљена као проценат одговарајуће контроле, док је у контролној групи крва квантификација изведена као проценат између контролне групе у датом периоду испитивања и јединствене контроле -30 дана пре очекиваног термина тељења. Резултати су представљени као средња вредност \pm S.E

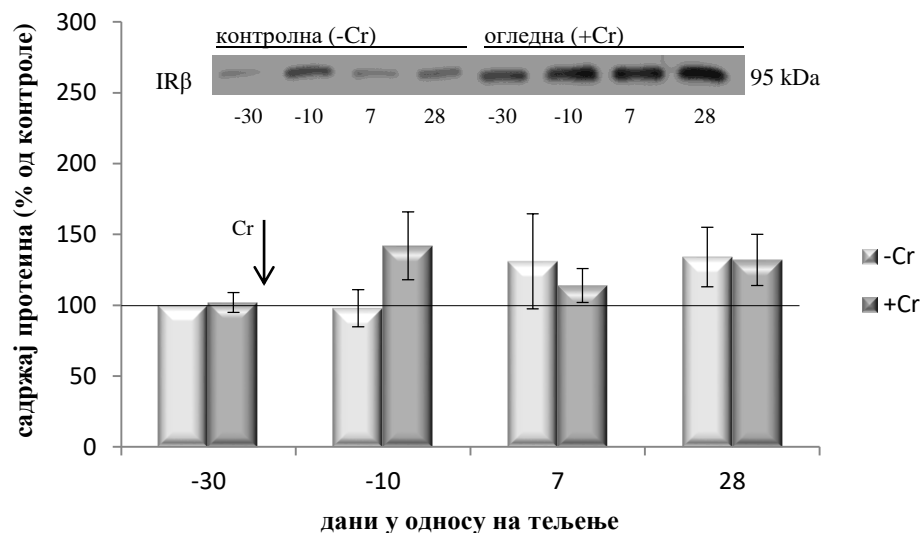
Тумачење: Хистограми представљају заступљеност GLUT4 код огледне групе, изражену процентуално у односу на одговарајућу контролу (код које је заступљеност GLUT4 сведена на вредност од 100%). ↓ Стрелица означава време почетка апликације хрома

На графикону се може запазити да у огледној групи крава долази до повећања садржаја глукозног транспортера под утицајем додатог хрома. Експериментални резултати добијени анализом заступљености GLUT4 у лизату мишићног ткива у огледној групи крава показују да третман хромом не мења значајно његову заступљеност у мишићном ткиву у поређењу са одговарајућом контролом. У периодима 30 и 10 дана пре очекиваног термина тељења садржај протеина је био 117 % и 126 %, док је у периоду 7 дана после тељења садржај протеина GLUT4 био на највишем нивоу (146 %, $p=0,22$ у односу на контролну групу у истом периоду), а његова заступљеност је опала 28. дана после тељења (114 %, $p=0,73$ у односу на контролну групу у истом периоду).

5.2. Заступљеност протеина инсулинског сигналног пута у субкутаном масном ткиву

5.2.1. Заступљеност протеина IR β у субкутаном масном ткиву

На слици 8 приказана је заступљеност протеина IR β у субкутаном масном ткиву у свим периодима испитивања, и то у виду хистограма и репрезентативног Western blota.



Слика 8. Протеински садржај IR β код контролних (-Cr) и огледних крава (+Cr) у субкутаном масном ткиву током перипарталног периода

Репрезентативни имуноблотови су приказани на врху слике, а квантификација заступљености IR β у огледној групи представљена као проценат одговарајуће контроле, док је у контролној групи крва квантификација изведена као проценат између контролне групе у датом периоду испитивања и јединствене контроле -30 дана пре очекиваног термина тељења. Резултати су представљени као средња вредност \pm S.E

Тумачење: Хистограми представљају заступљеност IR β код огледне групе, изражену процентуално у односу на одговарајућу контролу (код које је заступљеност рецептора сведена на вредност од 100%).

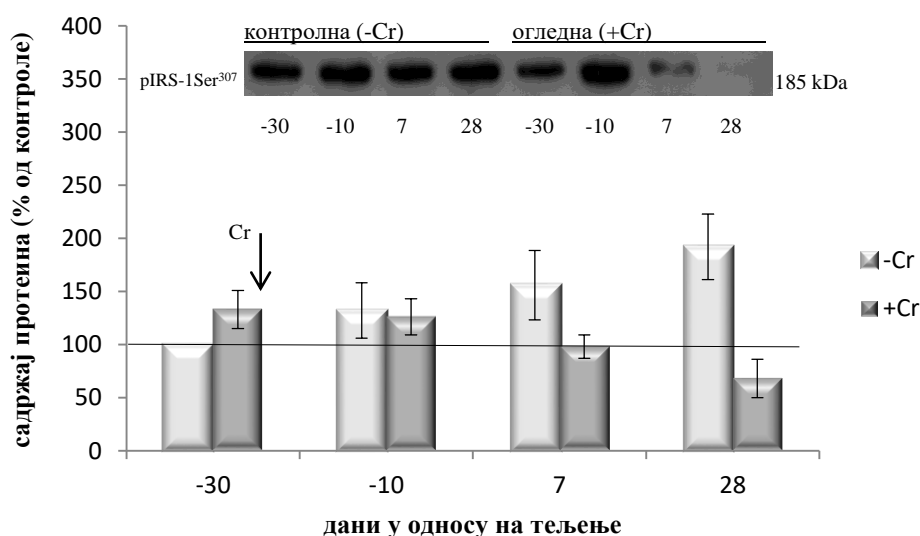
↓ Стрелица означава време почетка апликације хрома

Из података приказаних на графикону може се закључити да се заступљеност протеина IR β у субкутаном масном ткиву није значајно мењала под утицајем додатог хрома. Ипак, примећени су поједини трендови. Пет дана пре давања хрома заступљеност протеина IR β је уједначена између група и није било статистички значајне разлике ($p=0,83$). Десет дана пре очекиваног термина тељења повећана је заступљеност протеина IR β у огледној групи крава и тада је био на највишем нивоу (142 %, $p=0,35$ у односу на контролну групу у истом периоду). Експериментални резултати добијени анализом заступљености протеина у оба испитивана периода након тељења показују да третман хромом доводи до смањења заступљености

протеина IR β у субкутаном масном ткиву (114 % и 132 %) у поређењу са одговарајућом контролом. Статистичка значајност разлика није утврђена ни у једном испитиваном периоду. Код контролне групе крава заступљеност протеина IR β је била уједначена у периодима пре тељења (100 % и 98 %) док је у периодима после тељења 7. и 28. дана забележена повећана заступљеност протеина инсулинског рецептора (131 % и 134 %).

5.2.2. Заступљеност протеина pIRS-1Ser³⁰⁷ у субкутаном масном ткиву

На слици 9 приказана је заступљеност протеина pIRS-1Ser³⁰⁷ у субкутаном масном ткиву у свим периодима испитивања, и то у виду хистограма и репрезентативног Western blota.



Слика 9. Заступљеност протеина pIRS-1 Ser³⁰⁷ код контролних (-Cr) и огледних крава (+Cr) у субкутаном масном ткиву током перипарталног периода

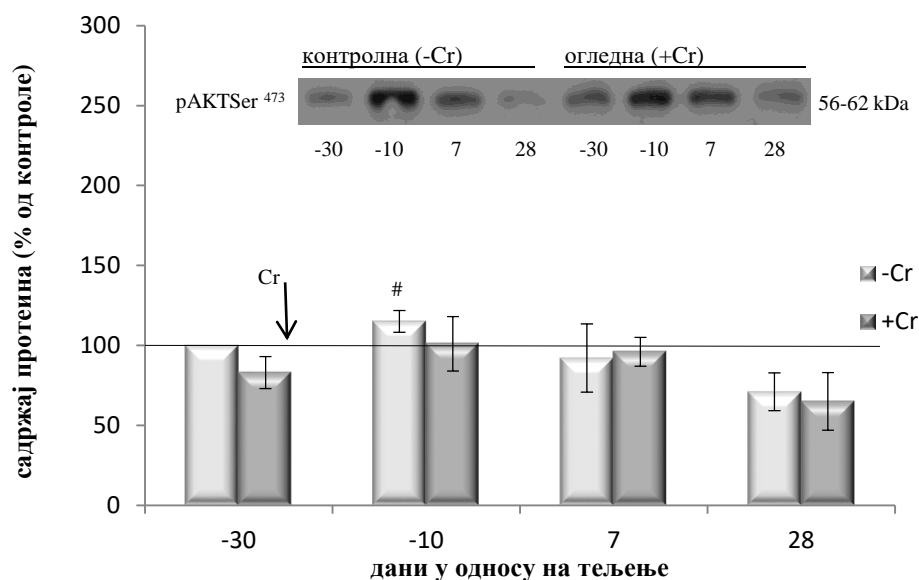
Репрезентативни имуноблотови су приказани на врху слике, а квантификација заступљености pIRS-1 Ser³⁰⁷ у огледној групи представљена је као проценат одговарајуће контроле, док је у контролној групи крава квантификација изведена као проценат између контролне групе у датом периоду испитивања и јединствене контроле -30 дана пре очекиваног термина тељења. Резултати су представљени као средња вредност \pm S.E

Тумачење: *Хистограми представљају заступљеност pIRS-1 Ser³⁰⁷ код огледне групе, изражену процентуално у односу на одговарајућу контролу (код које је заступљеност pIRS-1 Ser³⁰⁷ сведена на вредност од 100%). ↓ Стрелица означава време почетка апликације хрома*

На слици 9 се може запазити да је код огледне групе крава током давања хрома у оброк заступљеност протеина pIRS-1 Ser³⁰⁷ у субкутаном масном ткиву постепено опадала од 133 % ($p=0,08$ у односу на контролну групу у истом периоду) 30. дана пре очекиваног термина тељења, до нивоа 68 % ($p=0,41$ у односу на контролну групу у истом периоду) који је забележен 28. дана после тељења. Посматране промене у заступљености pIRS-1 Ser³⁰⁷ у субкутаном масном ткиву нису биле статистички значајне. У контролној групи крава примећен је постепени пораст заступљености протеина pIRS-1 Ser³⁰⁷ у субкутаном масном ткиву. Вредности су биле пре очекиваног термина тељења 132 % док су после тељења 7. и 28. дана износиле 156 % и 192 %. Статистичка значајност разлике није утврђена.

5.2.3. Заступљеност протеина pAKT Ser⁴⁷³ у субкутаном масном ткиву

На слици 10 приказана је заступљеност протеина pAKT Ser⁴⁷³ у субкутаном масном ткиву у свим периодима испитивања, и то у виду хистограма и репрезентативног Western blota.



Слика 10. Заступљеност протеина pAKT Ser⁴⁷³ код контролних (-Cr) и огледних крава (+Cr) у субкутаном масном ткиву током перипарталног периода

Репрезентативни имуноблотови су приказани на врху слике, а квантификација заступљености pAKT Ser⁴⁷³ у огледној групи представљена је као проценат одговарајуће контроле, док је у контролној групи крава квантификација изведена као проценат између контролне групе у датом периоду испитивања и јединствене контроле -30 дана пре очекиваног термина тельења. Резултати су представљени као средња вредност \pm S.E.

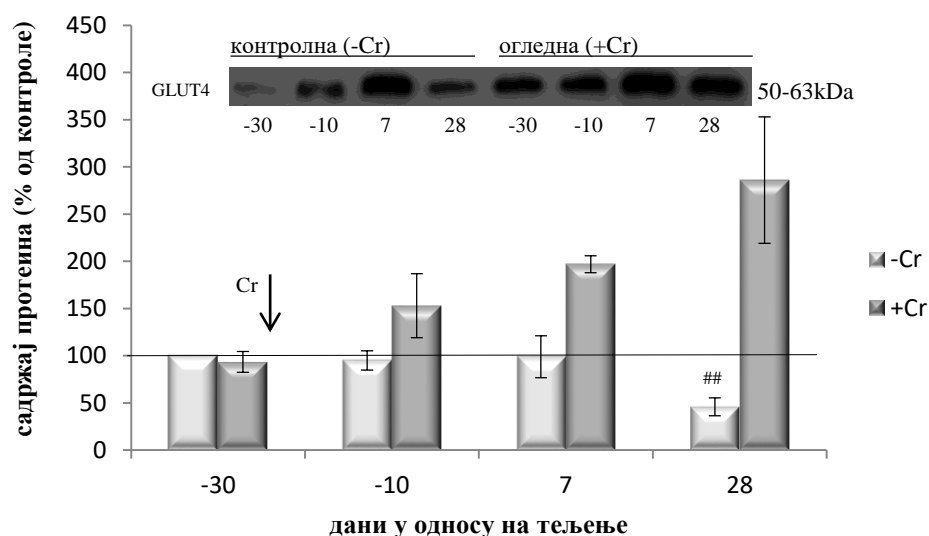
Тумачење: Хистограма представљају заступљеност pAKT Ser⁴⁷³ код огледне групе, изражену процентуално у односу на одговарајућу контролу (код које је заступљеност pAKT Ser⁴⁷³ сведена на вредност од 100%). ↓ Стрелица означава време почетка апликације хрома. # - указује на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између контролне групе у датом времену испитивања и јединствене контроле -30Cr-

Резултат анализе заступљености протеина pAKT Ser⁴⁷³ у узорцима субкутаног масног ткива није показао статистички значајну разлику код огледних крава током целокупног периода испитивања, али је примећено да је заступљеност протеина била значајно повишена ($p=0,04$) у контролној групи 10. дана пре очекиваног термина тельења (115 %) у поређењу са 30. даном пре очекиваног термина тельења (100 %). У периодима после тельења у контролној групи крава постепено је опадао садржај протеина (92 % и 71 %, појединачно).

Седмог дана после тељења садржај рАКТ Ser⁴⁷³ је у огледној групи крава био 96 %, а статистичка значајност разлике није утврђена ($p=0,88$) у односу на вредност код контролне групе истог дана. Најнижи ниво заступљености протеина рАКТ Ser⁴⁷³ у субкутаном масном ткиву огледне групе крава је забележена 28. дана после тељења (65 %), иако ни та разлика није била статистички значајна ($p=0,28$) у односу на контролну групу истог дана.

5.2.4. Заступљеност протеина GLUT4 у субкутаном масном ткиву

На слици 11 приказана је заступљеност протеина GLUT4 у субкутаном масном ткиву у свим периодима испитивања, и то у виду хистограма и репрезентативног Western blota



Слика 11. Протеински садржај GLUT4 код контролних (-Cr) и огледних крава (+Cr) у субкутаном масном ткиву током перипарталног периода

Репрезентативни имуноблотови су приказани на врху слике, а квантификација заступљености GLUT4 у огледној групи представљена је као проценат одговарајуће контроле, док је у контролној групи крава квантификација изведена као проценат између контролне групе у датом периоду испитивања и јединствене контроле -30 дана пре очекиваног термина тељења. Резултати су представљени као средња вредност $\pm S.E$

Тумачење: Хистограми представљају заступљеност GLUT4 код огледне групе, изражену процентуално у односу на одговарајућу контролу (код које је заступљеност GLUT4 сведена на вредност од 100%). ↓Стрелица означава време почетка апликације хрома.## - указује на статистички значајну разлику ($p < 0,01$) између контролне групе у датом времену испитивања и јединствене контроле -30Cr

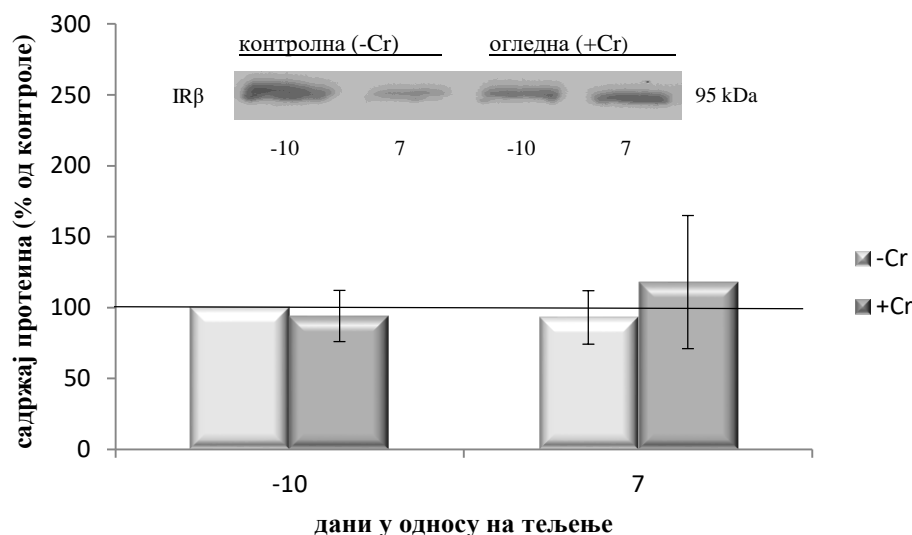
Са слике 11 се запажа да је заступљеност протеина GLUT4 у субкутаном масном, као и у мишићном ткиву расла са додавањем хрома, тако да је највећа заступљеност протеина у субкутаном масном ткиву код огледне групе крава била установљена у периоду 28. дана после тељења (286 %) и није била статистички значајно различита у односу на вредност код контролне групе истог дана ($p=0,07$).

Експресија транспортера за глукозу у субкутаном масном ткиву код контролне групе крава била је уједначена током периода пре тељења као и 7. дана после тељења (100 %, 95 % и 99 %, појединачно), а једино је 28. дана после тељења била статистички значајно нижа (46 %, $p=0,005$) у поређењу са 30. даном пре очекиваног термина тељења.

5.3. Заступљеност протеина инсулинског сигналног пута у ткиву јетре

5.3.1. Заступљеност протеина IR β у јетри

На слици 12 приказана је заступљеност протеина IR β у јетри у периодима 10 дана пре очекиваног термина тељења и 7 дана после тељења, и то у виду хистограма и репрезентативног Western blota.



Слика 12. Заступљеност протеина IR β код контролних (-Cr) и огледних крава (+Cr) у ткиву јетре током перипарталног периода

Репрезентативни имуноблотови су приказани на врху слике, а квантификација заступљености IR β у огледној групи представљена је као проценат одговарајуће контроле, док је у контролној групи крва квантификација изведена као проценат између контролне групе у датом периоду испитивања и јединствене контроле -10 дана пре очекиваног термина тељења. Резултати су представљени као средња вредност \pm S.E

Тумачење: Хистограми представљају заступљеност IR β код огледне групе, изражену процентуално у односу на одговарајућу контролу (код које је заступљеност рецептора сведена на вредност од 100%).

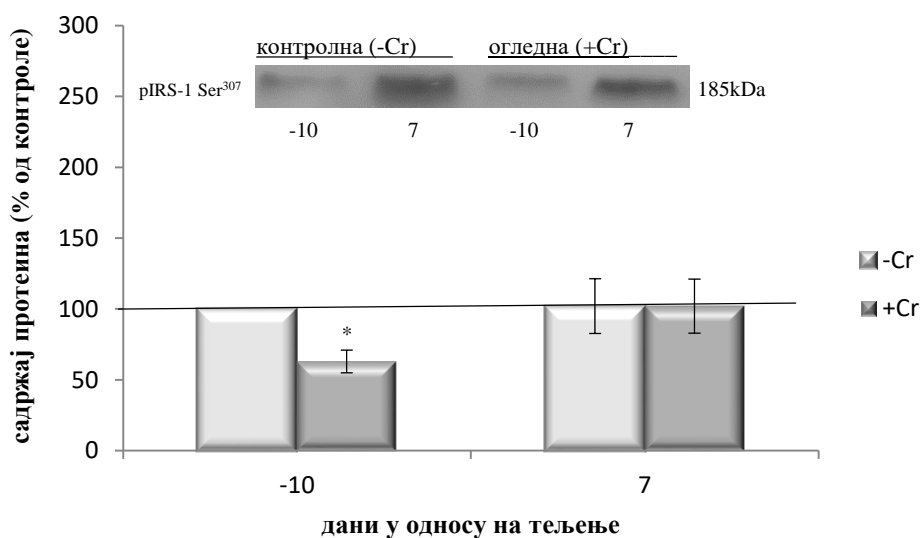
↓ Стрелица означава време почетка апликације хрома.

Експериментални резултати добијени анализом заступљености протеина IR β у ткиву јетре показују да није постојала статистички значајна разлика између група ни пре, али ни после тељења. Пре тељења заступљеност протеина IR β у огледној групи крава је била нижа (94 %) и није се значајно разликовала у односу на контролну групу у истом периоду ($p=0,79$), док је 7. дана после тељења у огледној групи заступљеност протеина била нешто виша (118 %), поређењу са периодом 10 дана пре тељења, статистичка значајност разлике није утврђена.

У контролној групи крава 7. дана после тељења примећено је смањење заступљености протеина инсулинског рецептора у ткиву јетре (93 %) у поређењу са периодом 10 дана пре тељења.

5.3.2. Заступљеност протеина pIRS-1 Ser³⁰⁷ у јетри

На слици 13 приказана је заступљеност протеина pIRS-1 Ser³⁰⁷ у јетри у периодима 10 дана пре очекиваног термина тељења и 7 дана после тељења, и то у виду хистограма и репрезентативног Western blota.



Слика 13. Протеински садржај протеина pIRS-1 Ser³⁰⁷ код контролних (-Cr) и огледних крава (+Cr) у ткиву јетре током перипарталног периода

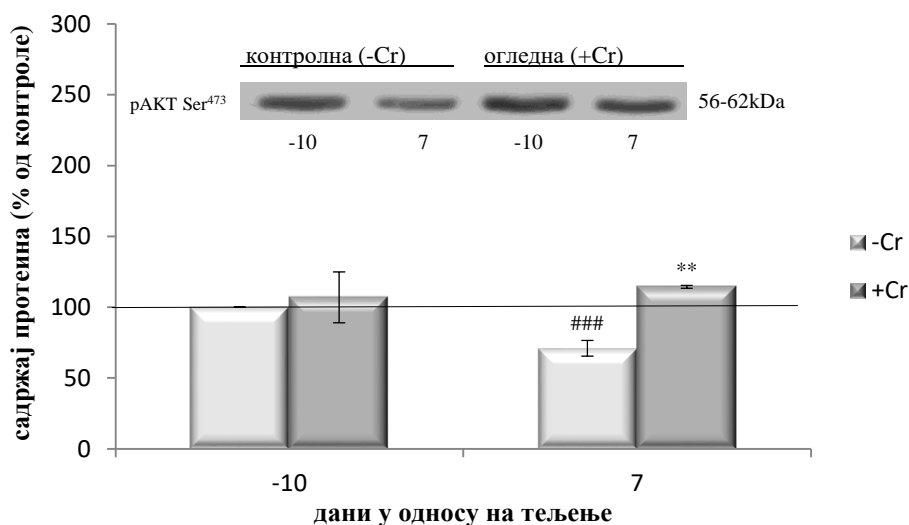
Репрезентативни имуноблотови су приказани на врху слике, а квантификација заступљености pIRS-1 Ser³⁰⁷ у огледној групи представљена је као проценат одговарајуће контроле, док је у контролној групи крава квантификација изведена као проценат између контролне групе у датом периоду испитивања и јединствене контроле -10 дана пре очекиваног термина тељења. Резултати су представљени као средња вредност \pm S.E

Тумачење: Хистограми представљају заступљеност pIRS-1 Ser³⁰⁷ код огледне групе, изражену процентуално у односу на одговарајућу контролу (код које је заступљеност pIRS-1 Ser³⁰⁷ сведена на вредност од 100%). ↓ Стрелица означава време почетка апликације хрома. *-указује на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између контролне и огледне групе у датом времену испитивања

Добијени резултати анализе ефекта хрома показују да је заступљеност pIRS-1 Ser³⁰⁷ у ткиву јетре била статистички значајно нижа у огледној (p<0,05) него у контролној групи крава само у периоду 10 дана пре очекиваног термина тељења (63 %). У периоду 7 дана после тељења заступљености pIRS-1 Ser³⁰⁷ су се уједначиле у обе испитиване групе (102 %, p=0,068). У контролној групи крава заступљеност протеина у лизату ткива јетре био је уједначен током испитиваног периода.

5.3.3. Заступљеност протеина pAKT Ser⁴⁷³ у јетри

На слици 14 приказана је заступљеност протеина pAKT Ser⁴⁷³ у јетри у периодима 10 дана пре очекиваног термина тељења и 7 дана после тељења, и то у виду хистограма и репрезентативног Western blota.



Слика 14. Заступљеност протеина pAKT Ser⁴⁷³ код контролних (-Cr) и огледних крава (+Cr) у ткиву јетре током перипарталног периода

Репрезентативни имуноблотови су приказани на врху слике, а квантификација заступљености pAKT Ser⁴⁷³ у огледној групи представљена је као проценат одговарајуће контроле, док је у контролној групи крава квантификација изведена као проценат између контролне групе у датом периоду испитивања и јединствене контроле -10 дана пре очекиваног термина тељења. Резултати су представљени као средња вредност ±S.E

Тумачење: Хистограми представљају заступљеност рАКТ Ser⁴⁷³ код огледне групе, изражену процентуално у односу на одговарајућу контролу (код које је заступљеност рАКТ Ser⁴⁷³ сведена на вредност од 100%). ↓ Стрелица означава време почетка апликације хрома. ** - указује на статистички значајну разлику ($p < 0,01$) између контролне и огледне групе у датом времену испитивања; ### - указује на статистички значајну разлику ($p < 0,001$) између контролне групе у датом времену испитивања и јединствене контроле -10Cr-

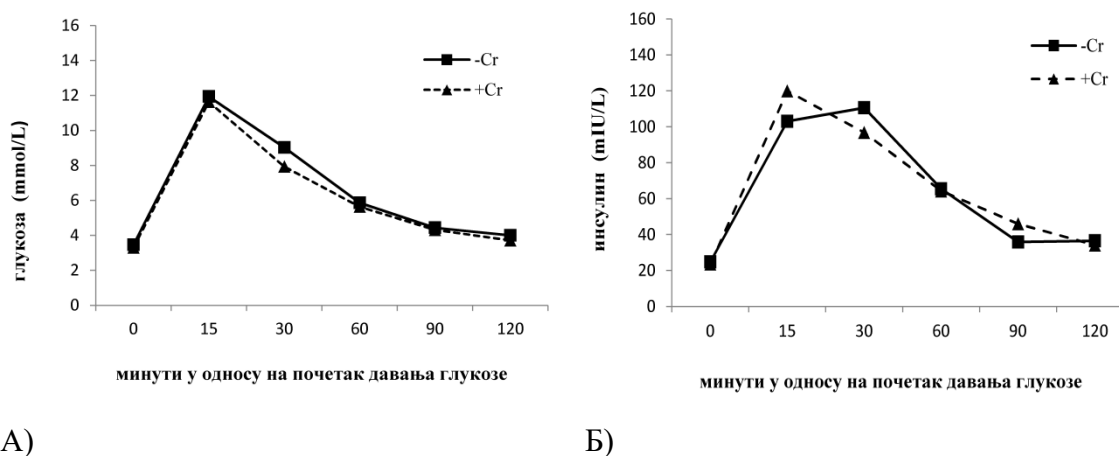
Резултат добијен одређивањем присуства рАКТ Ser⁴⁷³ у ткиву јетре у оба периода испитивања показује да хром доводи до повећања заступљености протеина (107 % и 114,4 %, појединачно), али је статистичка значајност промена у односу на одговарајућу контролу запажена само у периоду 7 дана након тељења ($p < 0,01$). У контролној групи крава заступљеност протеина рАКТ Ser⁴⁷³ је значајно опала ($p < 0,001$) 7 дана након тељења, у поређењу са периодом 10 дана пре очекиваног термина тељења.

5.4. IVGTT

IVGTT изведени су код испитиваних крава ($n=6$) непосредно пре апликације хрома (28 дана пре очекиваног термина тељења), а затим 7. дана пре очекиваног термина тељења као и 10. и 30. дана након тељења.

5.4.1. IVGTT изведен 28 дана пре очекиваног термина тељења

На графикону 1 приказана је динамика промена концентрације глукозе (А) и инсулина (Б) током првог IVGTT изведеног 28. дана пре очекиваног термина тељења.

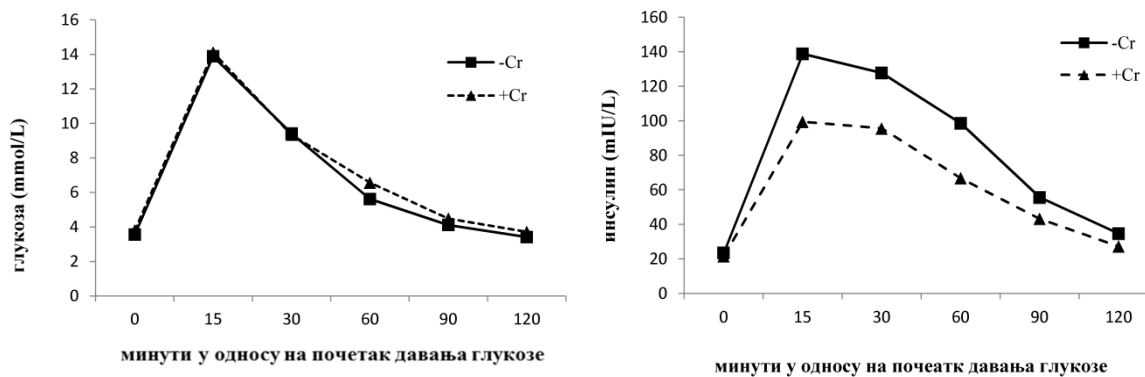


Графикон 1. Просечна концентрација глукозе (А) и инсулина (Б) код контролних -Cr (■) и огледних крава +Cr (▲) током првог IVGTT изведеног 28. дана пре очекиваног термина тељења. Резултати су приказани као средња вредност.

На графиконима (А и Б) се запажа да су трендови промена концентрације глукозе и инсулина били врло слични код контролне и огледне групе, тако да ни у једном минути теста није утврђена статистички значајна разлика између концентрација испитиваних параметара утврђених код контролне и огледне групе.

5.4.2. IVGTT изведен 7 дана пре очекиваног термина тељења

На графикаону 2 приказани су трендови промена концентрације глукозе (А) и инсулина (Б) током другог IVGTT изведеног 7. дана пре очекиваног термина тељења.



А)

Б)

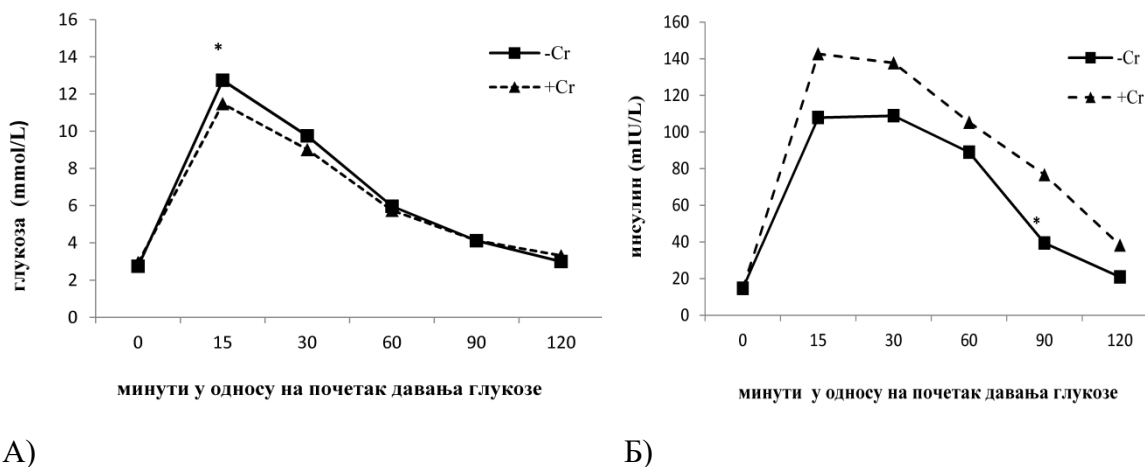
Графикон 2. Просечна концентрација глукозе (А) и инсулина (Б) код контролних -Cr (■) и огледних крава +Cr (▲) током другог IVGTT изведеног 7. дана пре очекиваног термина тељења. Резултати су приказани као средња вредност.

Тумачење: * означава постојање статистички значајне разлике између група $p < 0,05$, ** означава постојање статистички значајне разлике између група $p < 0,01$

Тренд промене концентрације глукозе (А) током IVGTT није био значајно различит између контролне и огледне групе. Међутим, инсулински одговор (Б) је био значајно израженији код контролне у односу на огледну групу. Наиме, 15., 30. и 60. минута, концентрација инсулина је била значајно већа код контролне у односу на огледну групу ($p=0,03$, $p=0,016$ и $p=0,017$, појединачно). У 90. и 120. минути испитивања концентрација инсулина је и даље била већа код контролне у односу на огледну групу, али та разлика није била статистички значајна.

5.4.3. IVGTT изведен 10 дана после тељења

На графикону 3 приказани су трендови промена концентрације глукозе (А) и инсулина (Б) током трећег IVGTT изведеног 10. дана после тељења.



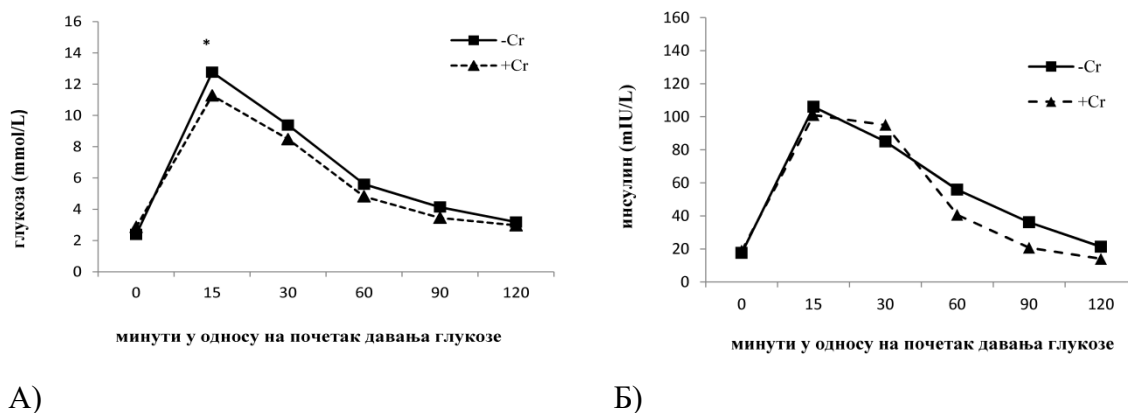
Графикон 3: Просечна концентрација глукозе (А) и инсулина (Б) код контролних -Cr (■) и огледних крава +Cr (▲) током трећег IVGTT изведеног 10. дана после тељења. Резултати су приказани као средња вредност.

Тумачење: * означава постојање статистички значајне разлике између група $p < 0,05$

На графикону А, запажа се да је пик концентрације глукозе који је постигнут у 15. минути теста у контролној групи био статистички значајно већи у поређењу са огледном групом ($p=0,019$). Током наставка теста до 120. минута, тренд промене концентрације глукозе није био статистички значајан. Инсулински одговор (Б) праћен у истом периоду је био значајно израженији код огледне групе и то у 15. и 90. минути ($p=0,027$ и $p=0,018$, појединачно).

5.4.4. IVGTT изведен 30 дана после тељења

На графикону 4 приказани су трендови промена концентрације глукозе (А) и инсулина (Б) током четвртог IVGTT изведеног 30. дана после тељења



Графикон 4. Просечна концентрација глукозе (А) и инсулина (Б) код контролних -Cr (■) и огледних крава +Cr (▲) током четвртог IVGTT изведеног 30. дана после тељења. Резултати су приказани као средња вредност.

Тумачење: * означава постојање статистички значајне разлике између група $p < 0,05$

На графикону А, запажа се да је концентрација глукозе на постигнутом максимуму 15. минута након давања болус инфузије глукозе била статистички значајно већа ($p=0,011$) код контролне у односу на огледну групу крава. Праћењем тренда промена концентрација глукозе у даљем току теста није била забележена значајна разлика, а тренд промена је био уједначен у обе групе. Инсулински одговор (Б) праћен у истом периоду није показао значајније промене између група.

5.5. Математички изведени параметри динамике промена концентрација глюкозе и инсулина током IVGTT

У резултатима су приказани одвојено параметри кинетике глюкозе и инсулина.

5.5.1. Параметри тренда промене концентрације глюкозе

У табели 2 приказани су параметри кинетике глюкозе током IVGTT у који је било укључено 6 крава. Базална концентрација глюкозе ($T_{0\text{glu}}$), степен опадања концентрације глюкозе током теста (k), полувреме елиминације глюкозе ($T_{1/2}$), као и површина испод криве глюкозе током IVGTT праћена од 0. до 120. минута (AUC_{glu}). Резултати су приказани као средња вредност \pm S.D.

Табела 2. Параметри кинетике глюкозе током IVGTT

параметри	група	-28	-7	+10	+30
$T_{0\text{glu}}$ (mmol/L)	-Cr	3,47 \pm 0,11 ^a	3,55 \pm 0,15 ^a	2,75 \pm 0,09 ^b	2,38 \pm 0,11 ^b
	+Cr	3,3 \pm 0,10 ^{ab}	3,8 \pm 0,20 ^a	2,95 \pm 0,34 ^{6b}	2,86 \pm 0,14 ^{6b}
k (% min)	-Cr	1,60 \pm 0,20 ^a	2,03 \pm 0,17 ^a	1,68 \pm 0,04 ^a	1,92 \pm 0,25 ^a
	+Cr	1,62 \pm 0,24 ^a	1,74 \pm 0,22 ^a	1,61 \pm 0,23 ^a	1,92 \pm 0,18 ^a
$T_{1/2}$ (min)	- Cr	46,49 \pm 5,17 ^a	35,49 \pm 3,39 ^a	41,29 \pm 1,13 ^a	38,66 \pm 3,95 ^a
	+Cr	48,80 \pm 9,02 ^a	43,18 \pm 5,41 ^a	48,31 \pm 7,75 ^a	37,69 \pm 3,45 ^a
AUC_{glu}	-Cr	777,21 \pm 26,84 ^a	790 \pm 28,15 ^a	779 \pm 9,49 ^a	760,25 \pm 54,13 ^a
	+Cr	732 \pm 36,58 ^a	837,54 \pm 32,14 ^{6b}	743,5 \pm 55,01 ^{ab}	674,13 \pm 23,40 ^a

Тумачење: а, б, в- различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар групе

Из табеле 2 се запажа да је базална вредност концентрације глюкозе код контролне групе била значајно нижа после тељења (2,75 \pm 0,09 mmol/L и 2,38 \pm 0,22 mmol/L) у односу на вредности пре тељења (3,47 \pm 0,11 mmol/L и 3,55 \pm 0,15 mmol/L). Код огледне групе су вредности базалних концентрација глюкозе после тељења (2,95 \pm 0,34 mmol/L и 2,86 \pm 0,14 mmol/L) биле значајно ниже само у односу на вредност одређену 7. дана пре тељања (3,55 mmol/L \pm 0,15 mmol/L). Између базалних вредности концентрација

глукозе измерених код огледне и контролне групе није било значајне разлике ни у једном испитиваном периоду.

Није утврђена значајна разлика у k вредности поређењем добијених вредности како унутар контролне тако и унутар огледне групе. Такође, није било значајних разлика између група ни у једном испитиваном периоду.

Полувреме елиминације глукозе ($T_{1/2}$) се такође није статистички значајно разликовало како унутар група тако ни поређењем група у временском периоду истраживања.

Математичким израчунавањем вредности површине испод криве глукозе (AUC_{glu}) унутар контролне групе животиња вредности су биле уједначене током периода испитивања ($777,21 \pm 26,84$, $790 \pm 28,15$, $779 \pm 9,49$, $760,25 \pm 54,13$, појединачно). Код огледне групе крава вредности AUC_{glu} су биле значајно више 7. дана пре очекиваног термина тељења ($837,54 \pm 32,14$) у поређењу са вредношћу добијеном на почетку периода испитивања тј. 28. дана пре очекиваног термина тељења ($732,21 \pm 36,58$) као и 30. дана после тељења ($674,13 \pm 23,40$). Ни у једном периоду није била забележена статистички значајна разлика између група.

5.5.2. Параметри тренда промене концентрације инсулина

У табели 3 су приказани параметри кинетике инсулина током IVGTT у који је било укључено 6 крава. Базална концентрација инсулина (T_{0ins}), највиша концентрација инсулина (Ins_{peak}), пораст инсулина (ΔMAX_{ins}) и површина испод криве инсулина током IVGTT праћена од 0. до 120. минута (AUC_{ins}). Резултати су приказани као средња вредност \pm S.D.

Табела 3. Параметри кинетике инсулина током IVGTT

параметри	група	-28	-7	+10	+ 30
T0 _{ins} (μ U/ml)	-Cr	24,90 \pm 2,70 ^a	23,44 \pm 2,36 ^a	14,69 \pm 1,20 ^b	17,63 \pm 1,86 ^b
	+Cr	23,53 \pm 1,63 ^a	21,59 \pm 2,41 ^a	14,56 \pm 0,96 ^{bB}	19,01 \pm 1,62 ^{aB}
INS _{peak} (μ U/ml)	-Cr	117,16 \pm 19,78 ^a	140,07 \pm 16,16 ^{a*}	112,52 \pm 11,68 ^{a*}	106,01 \pm 13,05 ^a
	+Cr	120,17 \pm 9,10 ^{aB}	102,86 \pm 11,40 ^a	148,65 \pm 19,58 ^b	101,79 \pm 9,41 ^a
Δ MAX _{ins}	-Cr	90,05 \pm 11,84 ^a	116,63 \pm 14,50 ^{a*}	97,83 \pm 10,83 ^{a*}	88,38 \pm 11,66 ^a
	+Cr	103,07 \pm 12,71 ^a	81,26 \pm 9,36 ^a	134,09 \pm 19,01 ^b	82,78 \pm 10,50 ^a
AUC _{ins}	-Cr	7813,47 \pm 175,94 ^a	10277,88 \pm 976,99 ^{B*}	8341,13 \pm 867,22 ^{aB*}	6717,57 \pm 560,73 ^a
	+Cr	7975,26 \pm 454,91 ^a	7513,94 \pm 795,29 ^a	11388,08 \pm 1308,94 ^b	5850,18 \pm 363,92 ^a

Тумачење: а, б, в- различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар групе, *- указује на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између контролне и огледне групе у датом времену испитивања

Профил секреције инсулина се разликовао код контролне и огледне групе крва 7 дана пре очекиваног термина тељења као и 10 дана после тељења. Наиме, пре тељења хром је узроковао смањење секреције инсулина у огледној групи док је после тељења изазвао повећану секрецију инсулина. Последишно, 7. дана пре очекиваног термина тељења INS_{peak}, Δ MAX_{ins}, AUC_{ins} су били значајно нижи у огледној у поређењу са контролном групом, док су 10. дана после тељења сви параметри кинетике инсулина били значајно виши у огледној групи у поређењу са контролном.

5.6. Математички израчунати показатељи инсулинске сензитивности

За обрачун RQUICKI било је неопходно у формулу уврстити, поред базалних вредности инсулина и глукозе приказаних у табелама 2. и 3. и базалну вредност NEFA за 6 крва из сваке групе којима је рађен IVGTT. Стога је у табели 4 приказана, поред RQUICKI и базална вредност NEFA. Резултати су приказани као средња вредност \pm S.E

Табела 4. Базална вредностконцентарције NEFA и RQUICKI

параметар	група	Дани у односу на тељење			
		-28	-7	+10	+ 30
базална NEFA (mmol/L)	-Cr	0,085±0,007 ^a	0,312±0,029 ^{b*}	0,735±0,079 ^{b*}	0,552±0,052 [*]
	+Cr	0,088±0,01 ^a	0,232±0,008 ^b	1,113±0,123 ^b	0,293±0,037 ^b
RQUICKI	-Cr	0,481±0,02 ^a	0,378±0,0 ^b	0,371±0,02 ^b	0,389±0,02 ^b
	+Cr	0,485±0,02 ^a	0,398±0,01 ^b	0,345±0,01 ^b	0,412±0,01 ^b

Тумачење: а, б, в, г- различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар групе, *- указује на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између контролне и огледне групе у датом времену испитивања

Базалне вредности концентрације NEFA су биле значајно више код контролне групе у поређењу са огледном групом крава 7. дана пре очекиваног термина тељења и 30 дана после тељења, док су биле статистички значајно ниже код контролне групе него код огледне групе 10 дана после тељења.

Вредности RQUICKI нису показале статистички значајне разлике између група током периода испитивања. У огледној групи, RQUICKI је значајно снижен после тељења док је у контролној групи остао константан у поређењу са вредностима утврђеним 7 дана пре очекиваног термина тељења и 10 дана после тељења.

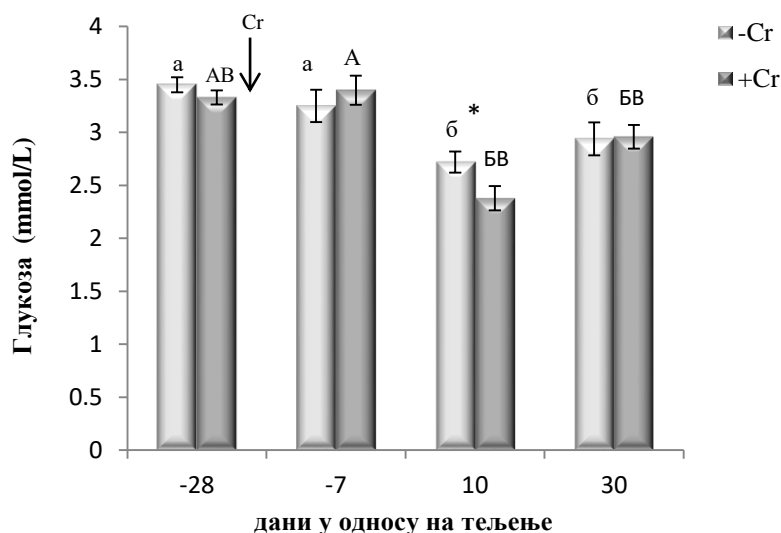
5.7. Биохемијски параметри крви

Од биохемијских параметара крви код испитиваних крава ($n=10$) одређивани су показатељи енергетског статуса (глукоза, NEFA и ВНВА), протеинског статуса (укупни протеини, албумин и уреа), липидног статуса (холестерол и TG), функционалног стања јетре (TB, AST и GGT) и минералног статуса (Mg, Ca и P).

5.7.1. Показатељи енергетског статуса

Од показатеља енергетског статуса приказане су концентрације глукозе, NEFA и ВНВА на графиконима 5, 6, и 7.

5.7.1.1. Глукоза



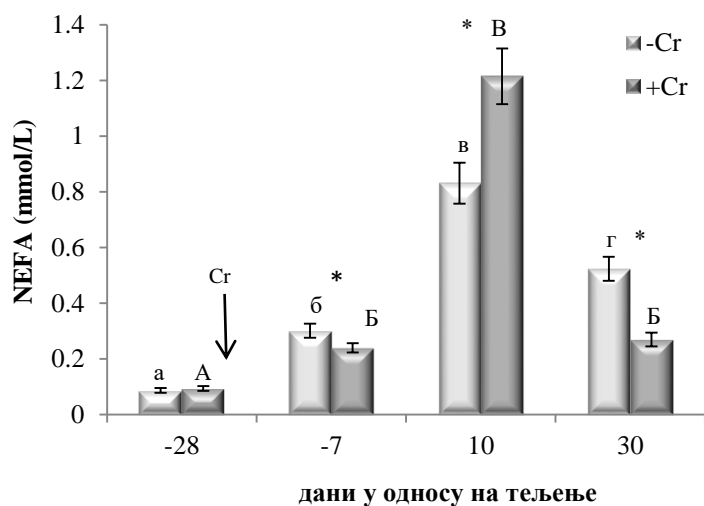
Графикон 5. Концентрација глукозе (mmol/L) у узорцима крвног серума код контролних (-Cr) и огледних крава (+Cr) током перипарталног периода. Резултати суприказани као средња вредност \pm S.E.

Тумачење: а, б, в- различита мала слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар контролне групе; А,Б,В- различита велика слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар огледне групе; *- указује на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између контролне и огледне групе у датом времену испитивања; ↓стрелица показује време почетка апликовања хрома

Из графикона 5 се запажа да су базалне вредности концентрације глукозе у обе групе биле ниже после тељења. Код контролне групе после тељења гликемија је износила $2,72 \pm 0,09$ mmol/L и $2,94 \pm 0,22$ mmol/L, а пре тељења $3,45 \pm 0,07$ mmol/L и $3,25 \pm 0,15$ mmol/L. Код огледне групе су вредности гликемије после тељења износиле $2,38 \pm 0,11$ mmol/L и $2,96 \pm 0,11$ mmol/L и те вредности су биле значајно ниже само у односу на вредност одређену 7. дана пре очекиваног термина тељања ($3,40 \pm 0,13$ mmol/L). Између базалних вредности гликемија измерених код контролне и огледне

групе статистички значајна разлика ($p < 0,05$) је утврђена само у периоду 10. дана после тељења.

5.7.1.2. NEFA



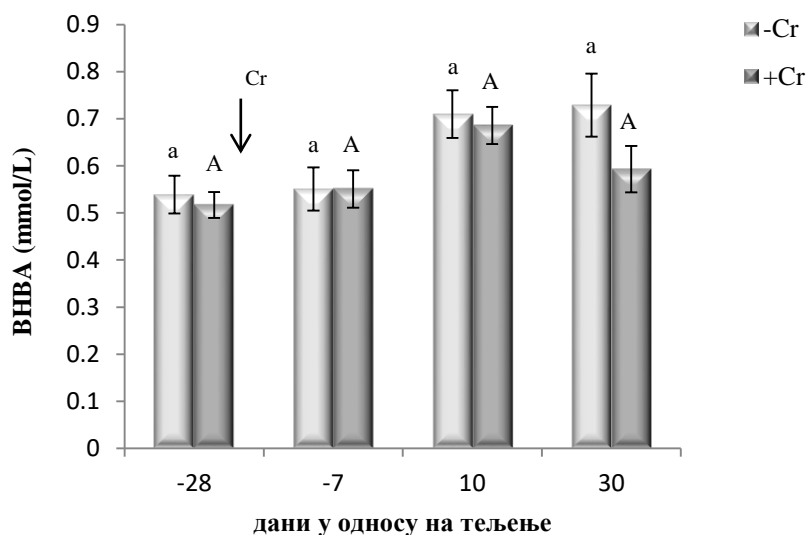
Графикон 6: Концентрација NEFA (mmol/L) у узорцима крвног серума код контролних (-Cr) и огледних крава (+Cr) током перипарталног периода. Резултати су приказани као средња вредност ± S.E.

Тумачење: а, б, в, г- различита мала слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар контролне групе; А, Б, В- различита велика слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар огледне групе; *- указује на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између контролне и огледне групе у датом времену испитивања; ↓ стрелица показује време почетка апликавања хрома

На графикону 6 се запажа да су се вредности концентарције NEFA код контролне групе крава статистички значајно разликовале у свим периодима испитивања. Најнижа вредност ($0,085 \pm 0,008$ mmol/L) забележена је 28 дана пре очекиваног термина тељења, а највиша вредност ($0,831 \pm 0,073$ mmol/L) десетог дана после тељења. Код огледне групе крава статистички значајне разлике су се појавиле у периоду 28 дана пре очекиваног термина тељења ($0,094 \pm 0,008$ mmol/L) у односу на период 10 дана после тељења ($1,215 \pm 0,100$ mmol/L), док се вредности измерене 7 дана пре очекиваног термина тељења и 30. дана после тељења нису статистички значајно разликовале ($0,240 \pm 0,002$ mmol/L и $0,270 \pm 0,024$ mmol/L, појединачно). У периодима 7

дана пре очекиваног термина тељења, као и 10. и 30. дана после тељења забележена је значајна разлика између контролне и огледне групе крава. Вредност концентрације NEFA код огледних крава 7 дана пре очекиваног термина тељења као и 30. дана после тељења је била смањена, а 10. дана после тељења била је повећана у односу на одговарајуће контроле.

5.7.1.3. ВНВА



Графикон 7: Концентрација ВНВА (mmol/L) у узорцима крвног серума код контролних (-Cr) и огледних крава (+Cr) током перипарталног периода. Резултати су приказани као средња вредност ± S.E.

Тумачење: а, б- различита мала слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар контролне групе; А, Б- различита велика слова изнад хистограма указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар огледне групе; ↓ стрелица показује време почетка апликавања хрома

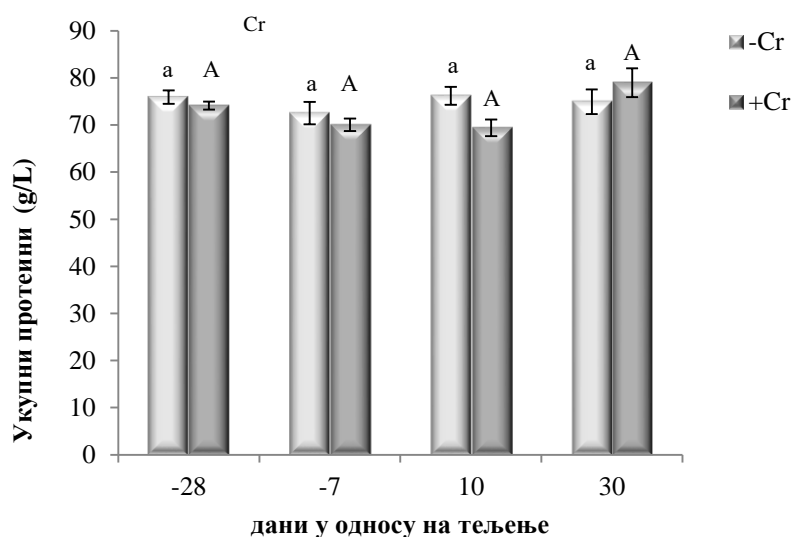
Из графикона 7 се може запазити да су код контролне групе концентрације ВНВА биле ниже у периоду пре очекиваног термина тељења 28. и 7. дана ($0,54 \pm 0,04$ mmol/L и $0,55 \pm 0,04$ mmol/L), и незнатно више у периоду после тељења 10. и 30. дана ($0,71 \pm 0,05$ mmol/L и $0,72 \pm 0,06$ mmol/L). Статистичка значајност није утврђена ни у једном посматраном периоду. Код огледне групе крава концентрације ВНВА биле су такође ниже у периоду пре очекиваног термина тељења 28 и 7 дана ($0,51 \pm 0,02$ mmol/L

и $0,55 \pm 0,03$ mmol/L, појединачно) у односу на вредности после тељења ($0,68 \pm 0,04$ mmol/L и $0,59 \pm 0,05$ mmol/L, појединачно) али та разлика није била статистички значајна ни у једном испитиваном периоду. Није било статистички значајне разлике између група када је реч о концентрацији ВНВА.

5.7.2. Показатељи протеинског статуса

Од показатеља протеинског статуса приказане су концентрације укупних протеина, албумина и урее на графиконима 8, 9 и 10.

5.7.2.1. Укупни протеини



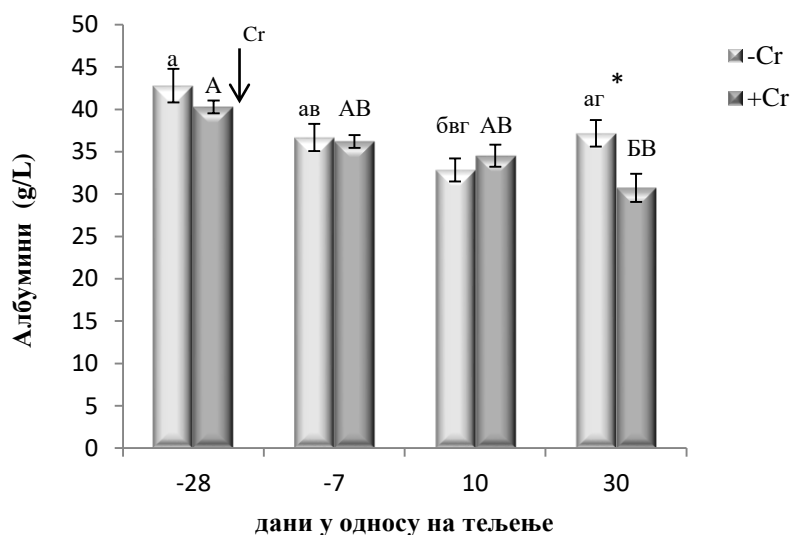
Графикон 8: Концентрација укупних протеина (g/L) у узорцима крвног серума код контролних (-Cr) и огледних крава (+Cr) током перипарталног периода. Резултати су приказани као средња вредност \pm S.E.

Тумачење: а, б- различита мала слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар контролне групе; А, Б- различита велика слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар огледне групе; ↓ стрелица показује време почетка апликовања хрома

На графикону 8 се може запазити да су вредности концентрација укупних протеина у контролној групи биле уједначене. Највиша концентрација је била забележена 10. дана после тељења ($76,19 \pm 1,87$ g/L), а најнижа 7 дана пре тељења

(72,52±2,37 g/L). Статистичка значајност разлике није утврђена. У огледној групи највиша концентарција укупних протеина је била у периоду 30 дана после тељења (78,98±3,04 g/L), а најнижа вредност је утврђена 10 дана после тељења. Статистичка значајност разлика није утврђена ни у једном периоду испитивања. Између група није утврђена статистичка значајност разлике у концентрацији укупних протеина.

5.7.2.2. Албумин



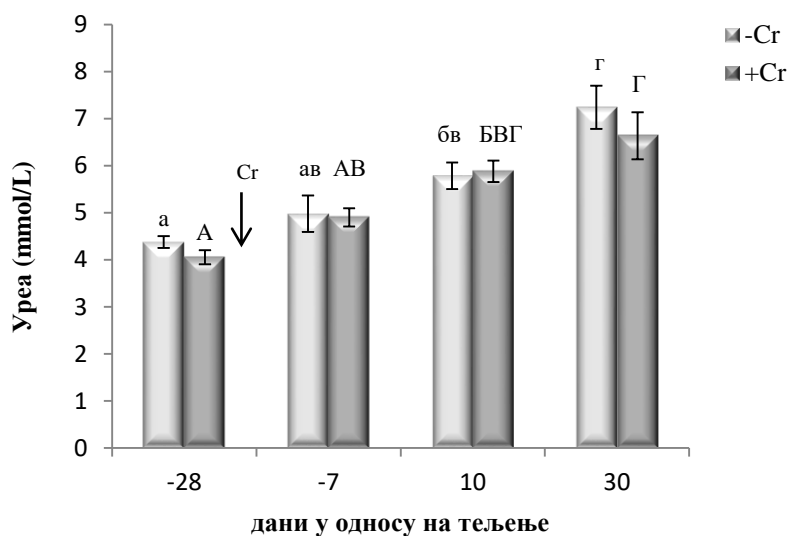
Графикон 9: Концентрација албумина (g/L) у узорцима крвног серума код контролних (-Cr) и огледних крава (+Cr) током перипарталног периода. Резултати су приказани као средња вредност ± S.E.

Тумачење. а, б, в, г- различита мала слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар контролне групе; А, Б, В- различита велика слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар огледне групе; *- указује на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између контролне и огледне групе у датом времену испитивања; ↓стрелица показује време почетка апликовања хрома

На графикону 9 на коме су приказане концентрације албумина може се приметити да, код контролне групе, вредности показују тенденцију опадања у периоду око тељења 7 дана пре очекиваног термина тељења (36,67±1,61 g/L) као и 10 дана после тељења (32,86±1,36 g/L), док су вредности 30 дана после тељења биле (37,17±1,56 g/L). Статистичка значајност разлике ($p < 0,05$) је утврђена између периода 28 дана пре

очекиваног термина тељења ($42,78 \pm 1,97$ g/L) и 10 дана после тељења. Код огледне групе крава концентрација албумина је била на највишем нивоу у периоду 28 дана пре очекиваног термина тељења ($40,29 \pm 0,75$ g/L), док је најнижа вредност забележена 30 дана после тељења ($30,72 \pm 1,67$ g/L) када је и утврђена статистичка значајност разлике у односу на контролну групу. Поређењем контролне и огледне групе утврђена је статистички значајна разлика само у периоду 30 дана после тељења.

5.7.2.3. Уреа



Графикон 10: Концентрација урее (mmol/L) у узорцима крвног серума код контролних (-Cr) и огледних крава (+Cr) током перипарталног периода. Резултати су приказани као средња вредност \pm S.E.

Тумачење. а, б, в, г- различита мала слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар контролне групе; А, Б, В, Г- различита велика слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар огледне групе; ↓ стрелица показује време почетка апликовања хрома

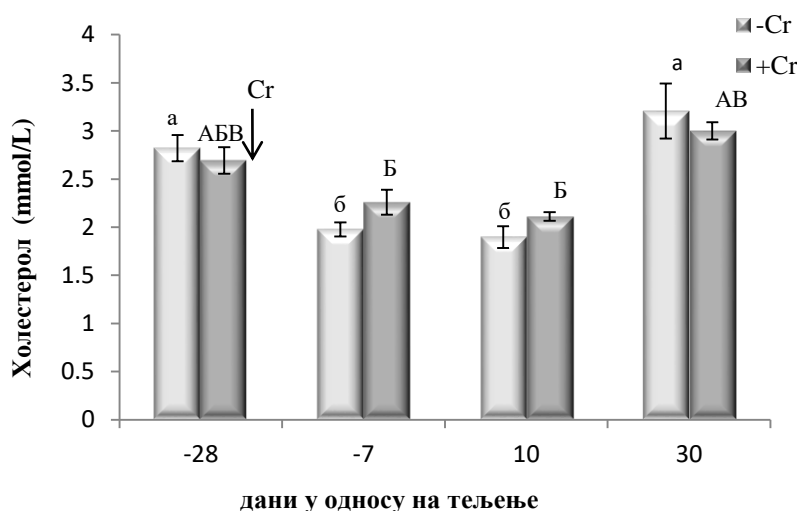
На графикону 10 се запажа да су концентрације урее најниже у периоду 28 дана пре очекиваног термина тељења ($4,37 \pm 0,12$ mmol/L) док су највише концентрације забележене после тељења ($5,78 \pm 0,28$ mmol/L и $7,24 \pm 0,46$ mmol/L) и биле су значајно веће у односу на први испитивани период. Осим тога, значајна разлика је утврђена између периода 7 дана пре очекиваног термина тељења и 30 дана

после тељења код контролне групе крава. У огледној групи крава током периода испитивања концентрације уреје су такође показивале тенденцију постепеног пораста. Значајне разлике у концентрацијама су утврђене између периода 28 дана пре очекиваног термина тељења ($4,05 \pm 0,15$ mmol/L) и 30 дана после тељења ($6,63 \pm 0,50$ mmol/L). Између контролне и огледне групе није утврђена статистичка значајност разлике.

5.7.4. Показатељи липидног статуса

Од показатеља липидног статуса приказане су концентрације холестерола и TG на графиконима 11 и 12.

5.7.4.1. Холестерол



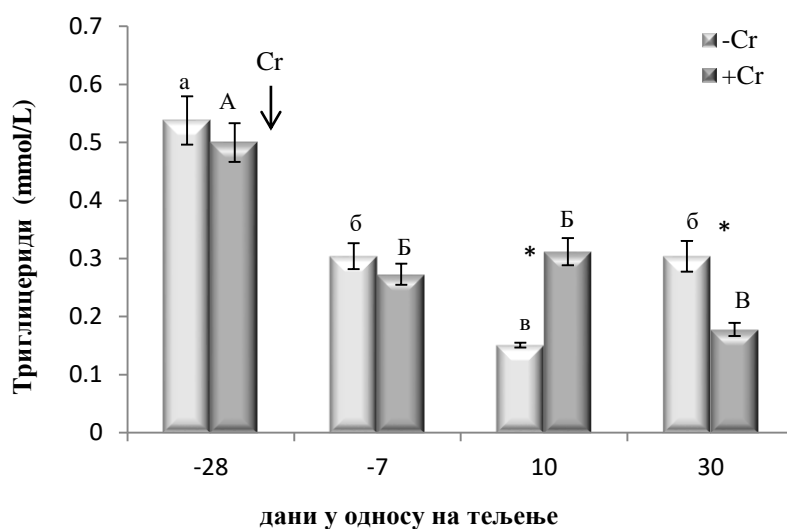
Графикон 11: Концентрација холестерола (mmol/L) у узорцима крвног серума код контролних (-Cr) и огледних крава (+Cr) током перипарталног периода. Резултати су приказани као средња вредност \pm S.E.

Тумачење. а, б, в- различита мала слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар контролне групе; А, Б, В- различита велика слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар огледне групе; ↓стрелица показује време почетка апликовања хрома

На графикону 11 се може запазити да су концентрације холестерола значајно ниже у периоду око тељења тј. 7 дана пре и 10 дана после тељења, када су просечно

износиле $1,97 \pm 0,07$ mmol/L и $1,89 \pm 0,11$ mmol/L, у поређењу са вредностима измереним 28 дана пре очекиваног термина тељења ($2,82 \pm 0,13$ mmol/L) и 30 дана после тељења ($3,02 \pm 0,28$ mmol/L). У огледној групи је такође примећен пад концентрације холестерола у периоду око тељења ($2,25 \pm 0,13$ mmol/L и $2,11 \pm 0,04$ mmol/L) у поређењу са вредностима измереним на почетку ($2,69 \pm 0,13$ mmol/L) и на крају испитивања ($3,00 \pm 0,09$ mmol/L). Статистички значајна разлика је утврђена само између периода непосредно око тељења и 30. дана после тељења. Статистичка значајност разлика није утврђена између контролне и огледне групе крва.

5.7.4.2. TG



Графикон 12: Концентрација TG (mmol/L) у узорцима крвног серума код контролних (-Cr) и огледних крва (+Cr) током перипарталног периода. Резултати су приказани као средња вредност \pm S.E.

Тумачење. а, б, в- различита мала слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар контролне групе; А, Б, В- различита велика слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар огледне групе; *- указује на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између контролне и огледне групе у датом времену испитивања; ↓стрелица показује време почетка апликавања хрома

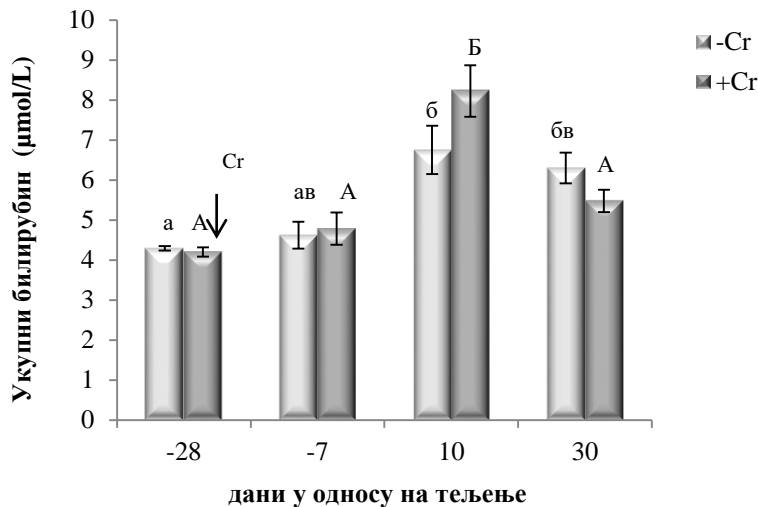
На графикону 12 се запажа да су најниже концентрације TG биле 10. дана после тељења код контролне групе ($0,15 \pm 0,04$ mmol/L) и да су се статистички значајно разликовале у односу на вредности утврђене код контролне групе 28 и 7 дана пре

очекиваног термина тељења ($0,53 \pm 0,01$ mmol/L и $0,30 \pm 0,02$ mmol/L), као и 30 дана после тељења ($0,30 \pm 0,02$ mmol/L). Код огледне групе значајно нижа концентрација TG у односу на остале периоде испитивања је забележена 30. дана после тељења ($0,18 \pm 0,01$ mmol/L). Највиша концентрација је постојала 28 дана пре очекиваног термина тељења када је износила ($0,5 \pm 0,03$ mmol/L) и статистички се значајно разликовала у односу на периоде 7 дана пре очекиваног термина тељења ($0,27 \pm 0,01$ mmol/L) и 10 и 30 дана после тељења ($0,31 \pm 0,02$ mmol/L и $0,18 \pm 0,01$ mmol/L). Између група је постојала статистички значајна разлика у концентрацијама TG у периодима 10 и 30 дана после тељења.

5.7.5. Показатељи функционалног стања јетре

Од показатеља функционалног стања јетре приказане су концентрације ТВ као и активности AST и GGT на графиконима 13, 14 и 15.

5.7.5.1. ТВ

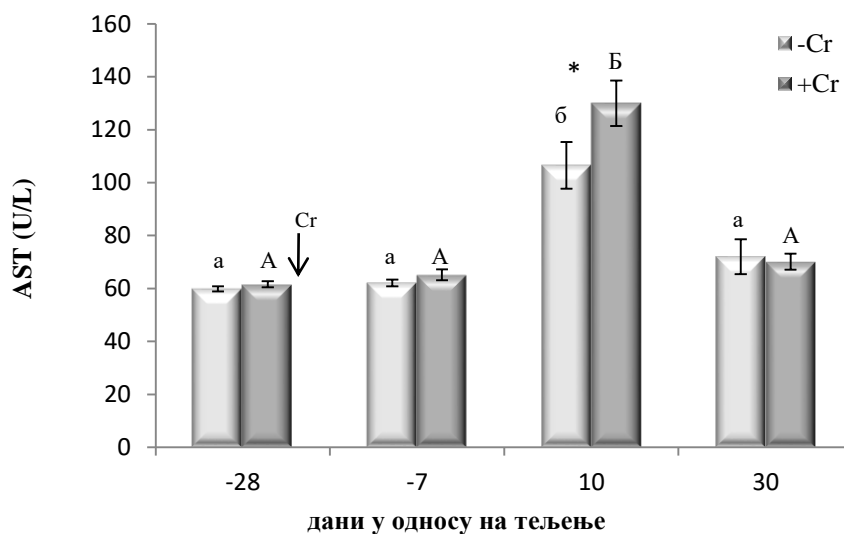


Графикон 13: Концентрације ТВ ($\mu\text{mol/L}$) у узорцима крвног серума код контролних (-Cr) и огледних крава (+Cr) током перипарталног периода. Резултати су приказани као средња вредност \pm S.E.

Тумачење. а, б, в- различита мала слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар контролне групе; А, Б- различита велика слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар огледне групе; ↓ стрелица показује време почетка апликовања хрома

На графикону 13 се примећује да су концентрације ТВ у контролној групи биле веће у периоду после тељења, 10. дана ($6,72 \pm 0,60 \mu\text{mol/L}$) и 30. дана ($6,30 \pm 0,38 \mu\text{mol/L}$). Највиша концентрација код контролне групе била је статистички значајно већа у поређењу са концентрацијама измереним 28 дана ($4,29 \pm 0,05 \mu\text{mol/L}$) и 7 дана пре очекиваног термина тељења ($4,62 \pm 0,34 \mu\text{mol/L}$). Унутар огледне групе највећа концентрација ТВ ($8,22 \pm 0,64 \mu\text{mol/L}$) је утврђена 10 дана после тељења, и статистички се значајно разликовала у односу на периоде пре тељења ($4,20 \pm 0,11 \mu\text{mol/L}$ и $4,78 \pm 0,40 \mu\text{mol/L}$) као и 30. дана после ($5,47 \pm 0,28 \mu\text{mol/L}$). Између група није утврђена статистичка значајност разлика.

5.7.5.2. AST



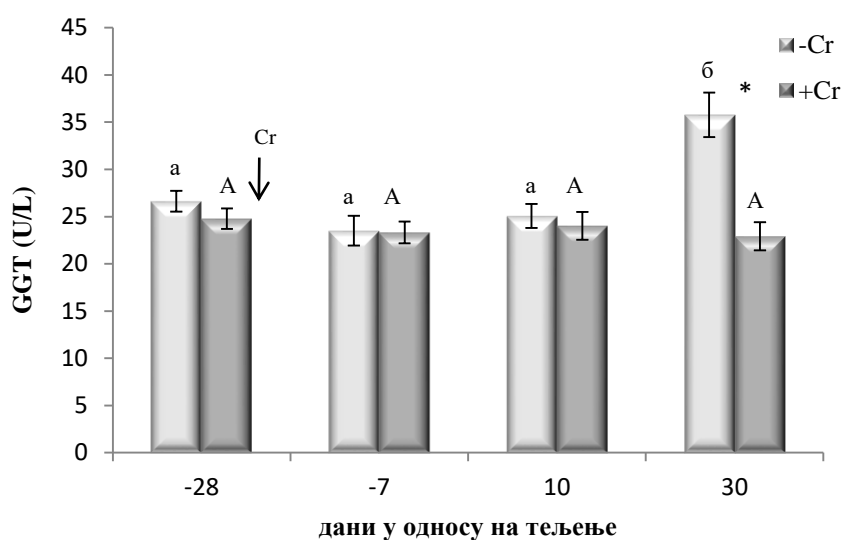
Графикон 14: Активност AST (U/L) у узорцима крвног серума код контролних (-Cr) и огледних крава (+Cr) током перипарталног периода. Резултати су приказани као средња вредност \pm S.E.

Тумачење. а, б- различита мала слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар контролне групе; А,Б- различита велика слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар огледне групе; *- указује на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између контролне и огледне групе у датом времену испитивања; ↓стрелица показује време почетка апликавања хрома

Са графикона 14 се може уочити да су највише активности AST у контролној групи утврђене у периоду 10 дана после тељења ($106,52 \pm 1,26 \text{ U/L}$) и значајно су се

разликовале у односу на периоде пре тељења ($59,87 \pm 0,96$ U/L и $62,10 \pm 1,26$ U/L) и 30. дана после тељења ($72,00 \pm 6,61$ U/L). Унутар огледне групе крава активност AST била је такође највиша у периоду 10 дана после тељења ($129,99 \pm 8,60$ U/L) и статистички се значајно разликовала у односу на периоде пре тељења ($61,58 \pm 1,16$ U/L и $65,20 \pm 2,06$ U/L) и 30. дана после тељења ($70,13 \pm 2,96$ U/L). Статистичка значајност разлика је утврђена између група 10. дана после тељења.

5.7.5.3. GGT



Графикон 15: Активност GGT (U/L) у узорцима крвног серума код контролних (-Cr) и огледних крава (+Cr) током перипарталног периода. Резултати су приказани као средња вредност \pm S.E.

Тумачење. а, б- различита мала слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар контролне групе; А,Б- различита велика слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар огледне групе; *- указује на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између контролне и огледне групе у датом времену испитивања; ↓ стрелица показује време почетка апликовања хрома

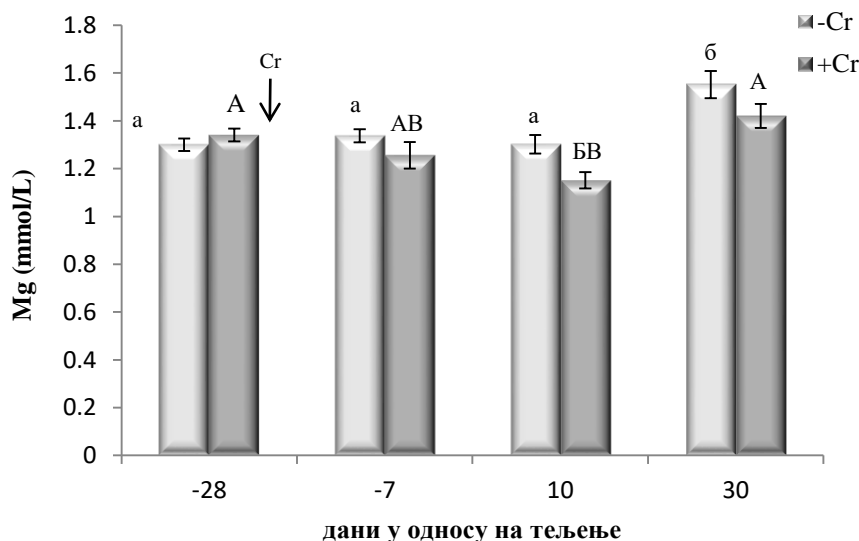
На графикону 15 се примећује да су активности GGT у контролној групи највише у последњем испитиваном периоду када су износиле ($35,77 \pm 2,34$ U/L) и биле су статистички значајно више у поређењу са периодима 28 и 7 дана пре очекиваног термина тељења ($26,62 \pm 1,09$ U/L и $23,50 \pm 1,58$ U/L) и 10 дана после тељења ($25,06 \pm 1,27$

U/L). У огледној групи крава активности GGT су биле уједначене у свим испитиваним периодима и није утврђена статистичка значајност разлике. Посматрањем активности GGT између група утврђено је да постоји статистички значајна разлика ($p < 0,05$) између контролне и огледне групе крава у периоду 30 дана после тељења ($35,77 \pm 2,34$ U/L наспрам $22,93 \pm 1,49$ U/L).

5.7.6. Показатељи минералног статуса

Од показатеља минералног статуса приказане су концентрације Mg, Са и Р на графиконима 16, 17 и 18

5.7.6.1. Mg

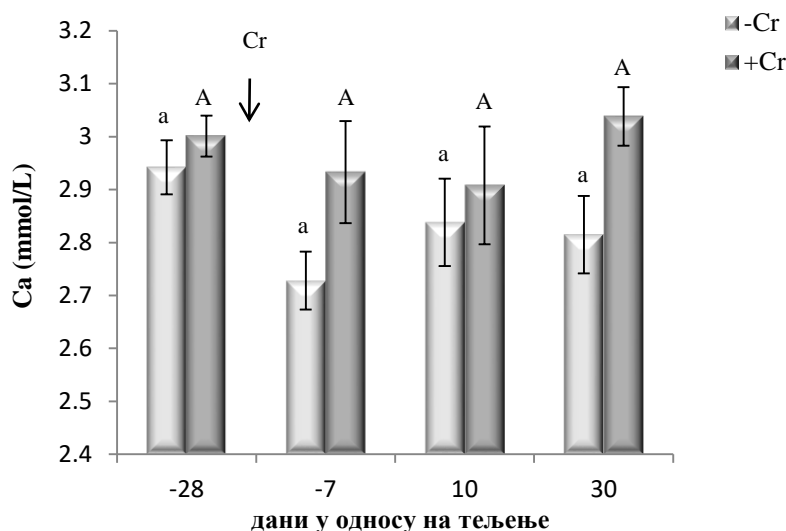


Графикон 16: Концентрација Mg (mmol/L) у узорцима крвног серума код контролних (-Cr) и огледних крава (+Cr) током перипарталног периода. Резултати су приказани као средња вредност \pm S.E.

Тумачење. а, б- различита мала слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар контролне групе; А, Б, В- различита велика слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар огледне групе; *- указује на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између контролне и огледне групе у датом времену испитивања; ↓стрелица показује време почетка апликовања хрома

На графикону 16 се може запазити да су највише концентрације Mg у контролној групи постојале у периоду 30 дана после тељења ($1,55 \pm 0,05$ mmol/L) у односу на периоде 28 и 7 дана пре очекиваног термина тељења ($1,30 \pm 0,02$ mmol/L и $1,33 \pm 0,02$ mmol/L) и 10 дана после тељења ($1,30 \pm 0,03$ mmol/L) када је и утврђена статистичка значајност разлике. У огледној групи најнижа вредност концентрације Mg је примећена у периоду 10 дана после тељења ($1,15 \pm 0,03$ mmol/L) и та вредност је била статистички значајно нижа у поређењу са концентрацијом измереном 28 дана пре очекиваног термина тељења ($1,34 \pm 0,02$ mmol/L) и 30 дана после тељења ($1,42 \pm 0,05$ mmol/L). Није утврђена статистичка значајност разлика поређењем контролне и огледне групе у одговарајућим периодима испитивања.

5.7.6.2. Ca



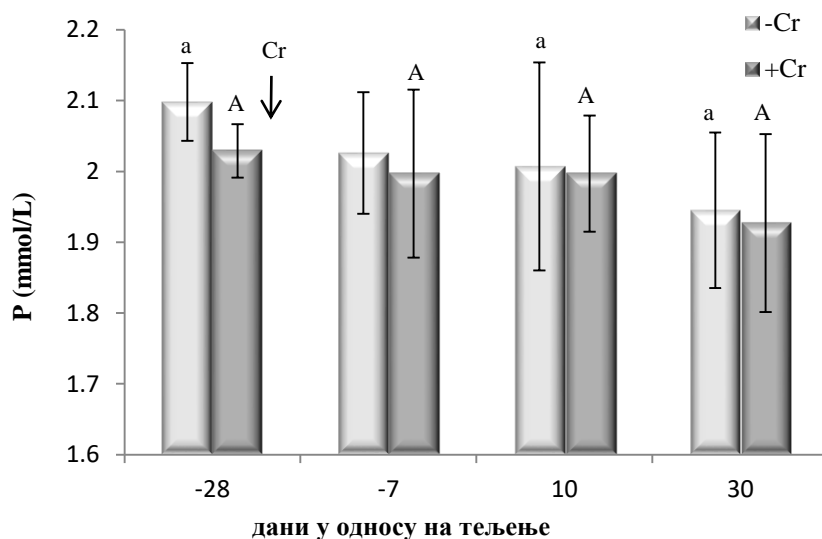
Графикон 17: Концентрација Ca (mmol/L) у узорцима крвног серума код контролних (-Cr) и огледних крава (+Cr) током перипарталног периода. Резултати су приказани као средња вредност \pm S.E.

Тумачење. а, б- различита мала слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар контролне групе; А,Б- различита велика слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар огледне групе; ↓стрелица показује време почетка апликовања хрома

Са графикона 17 се може уочити да су вредности Ca у контролној групи биле највише у почетном периоду испитивања ($2,94 \pm 0,05$ mmol/L), али није примећено

постојање статистички значајних разлика ни у једном испитиваном периоду. Код огледне групе највиша концентрација Са у серуму је измерена 30 дана после тељења ($3,03 \pm 0,05$ mmol/L), док су остале вредности биле уједначене и није утврђена статистичка значајност разлике. Такође није постојала статистичка значајност разлике између контролне и огледне групе.

5.7.6.3. P



Графикон 18: Концентрација P (mmol/L) у узорцима крвног серума код контролних(-Cr) и огледних крава (+Cr) током перипарталног периода. Резултати су приказани као средња вредност \pm S.E.

Тумачење. а, б- различита мала слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар контролне групе; А,Б- различита велика слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар огледне групе; ↓стрелица показује време почетка апликовања хрома

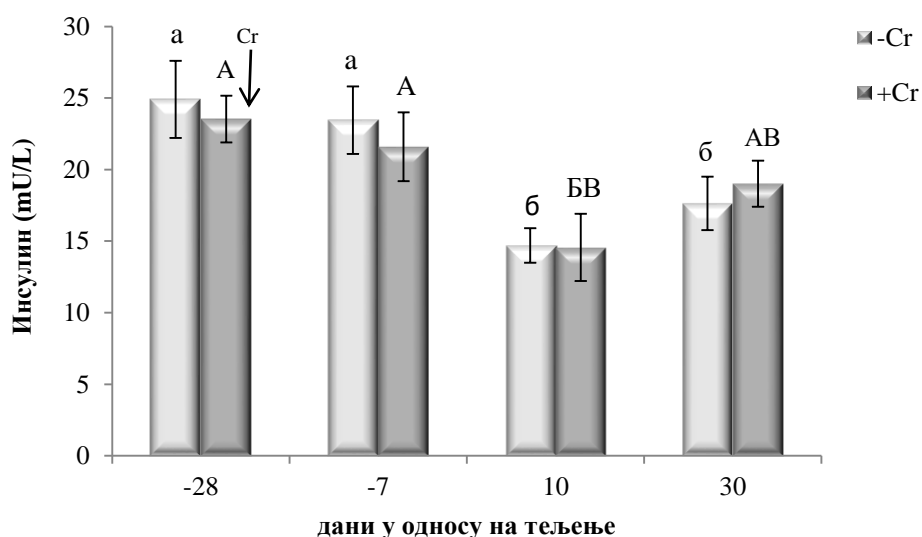
На графикону 18 се запажа да су концентрације P имале тенденцију постепеног пада током испитиваног периода код контролне групе животиња, а статистичка значајност разлика није уочена. Код огледне групе крава концентрације P су имале исту тенденцију. У периоду 30 дана после тељења концентрација P достигла је најнижу вредност ($1,92 \pm 0,12$ mmol/L). Статистичка значајност разлика у

концентрацији Р није била утврђена ни у огледној групи ни у поређењима између контролне и огледне групе крва.

5.8. Хормони енергетског метаболизма

Од хормона енергетског метаболизма приказане су концентрације инсулина и кортизола на графиконима 19 и 20.

5.8.1. Инсулин



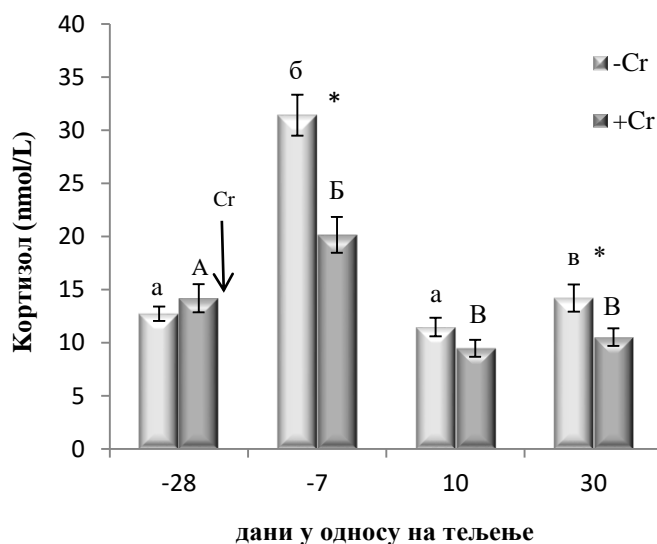
Графикон 19: Концентрација инсулина (mU/L) у узорцима крвног серума код контролних (-Cr) и огледних крва (+Cr) током перипарталног периода. Резултати су приказани као средња вредност \pm S.E.

Тумачење: а, б- различита мала слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар контролне групе; А, Б, В- различита велика слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар огледне групе; ↓стрелица показује време почетка апликовања хрома,

На графикону 19 се види да су базалне концентрације инсулина код контролне групе биле статистички значајно веће у периоду пре тељења у поређењу са вредностима после тељења. Код огледне групе крва базалне вредности концентрација инсулина су биле значајно више у 28 и 7 дана пре очекиваног термина тељења у поређењу са измереном концентрацијом 10. дана после тељења. Вредност инсулина

измерена 30. дана после тељења у огледној групи статистички се није значајно разликовала од вредности измерених у осталим периодима. Поређењем група није примећена статистички значајна разлика ни у једном посматраном периоду.

5.8.2. Кортизол



Графикон 20: Концентрација кортизола (nmol/L) у узорцима крвног серума код контролних (-Cr) и огледних крава (+Cr) током перипарталног периода. Резултати су приказани као средња вредност \pm S.E.

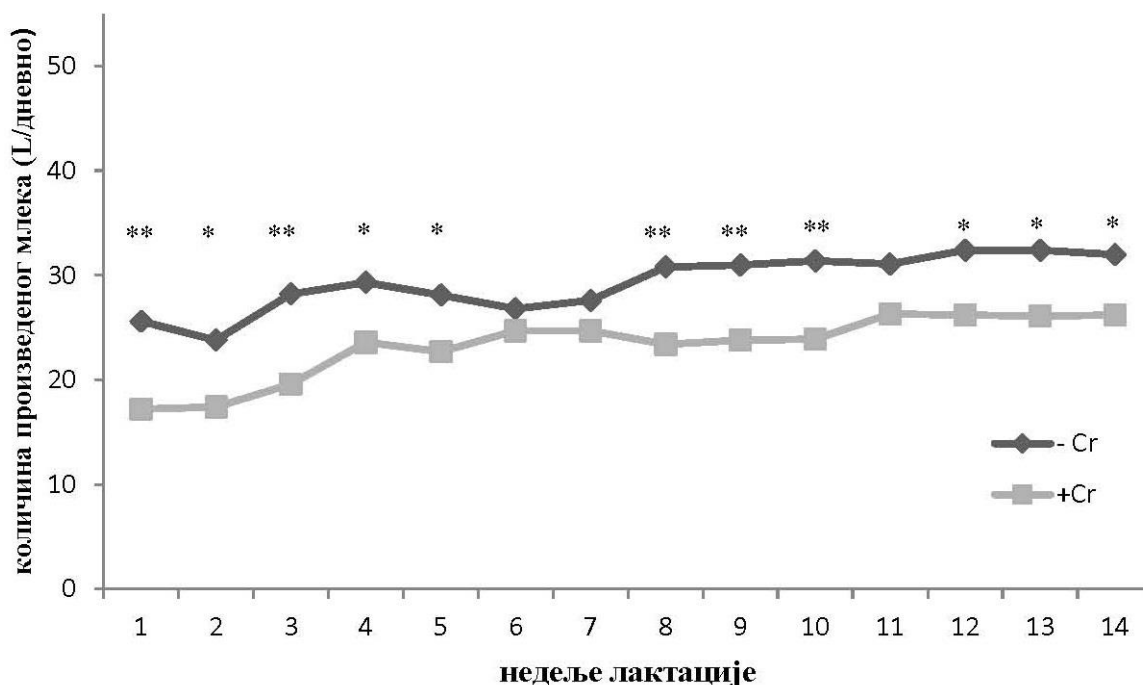
Тумачење. а, б- различита мала слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар контролне групе; А, Б, В- различита велика слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар огледне групе; *- указује на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између контролне и огледне групе у датом времену испитивања; ***- указује на статистички значајну разлику ($p < 0,001$) између контролне и огледне групе у датом времену испитивања ↓ стрелица показује време почетка апликовања хрома,

На графикону 20 се запажа да су измерене концентрације кортизола у обе групе биле највише у периоду 7 дана пре очекиваног термина тељења у поређењу са вредностима пре додавања хрома као и после тељења. Код огледне групе крава забележене су ниже концентрације кортизола у циркулацији ($p < 0,001$), а поређењем

група је примећена статистички значајна разлика 7. дана пре очекиваног термина тељења као и 30. дана после тељења($p<0,05$).

5.9. Млечност и састав млека

На графикону 21 приказна је млечност од 1. до 14. недеље лактације.



Графикон 21: Просечна млечност код контролне (-Cr) и огледне групе крава (+Cr) у периоду ране лактације (од 1. до 14. недеље лактације). Резултати су приказани као средња вредност

Тумачење *- указује на статистички значајну разлику ($p<0,05$) између контролне и огледне групе у датом периоду; ** - указује на статистички значајну разлику ($p<0,01$) између контролне и огледне групе у датом периоду

Млечност је била нижа код крава огледне групе у поређењу са контролом током периода ране лактације. Разлика је била статистички значајна током читавог испитиваног периода изузев у 6. и 7. недељи лактације када је млечност огледних крава била такође нижа, али не и значајно у поређењу са контролним кржавама.

У табели 4 приказана је просечна млечност и састав млека крава контролне и огледне групе 7. и 28. дана након тељења

Табела 4. Просечне вредности (средња вредност \pm S.E.) млечности и и састава млека код контролне (-Cr) и огледне групе (+Cr) крава

Дани у односу на тељење			
Параметар	група	+7	+28
Млечност (kg)	-Cr	25,6 \pm 1,65 [*]	29,3 \pm 2,10 [*]
	+Cr	17,2 \pm 0,20 ^a	23,6 \pm 1,61 ^b
ЕСМ, kg §	-Cr	27,02 \pm 1,68 [*]	29,73 \pm 2,26
	+Cr	18,38 \pm 0,40 ^a	24,15 \pm 1,69 ^b
Дани у односу на тељење			
Параметар	група	+7	+28
Маст, %	-Cr	3,86 \pm 0,07	3,64 \pm 0,02
	+Cr	3,95 \pm 0,09	3,73 \pm 0,1
Протеини, %	-Cr	3,30 \pm 0,06 ^a	3,11 \pm 0,06 ^b
	+Cr	3,28 \pm 0,05 ^a	3,05 \pm 0,06 ^b
Лактоза, %	-Cr	4,59 \pm 0,04	4,66 \pm 0,03
	+Cr	4,52 \pm 0,03	4,59 \pm 0,03

Тумачење:

a, б различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар групе,

**- указује на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између контролне (-Cr) и огледне групе (+Cr) у датом времену, § -енергетски коригована млечност (ЕСМ)= (kg млека \times 0,3246)+(kg млечне масти \times 12,96)+(kg протеина млека \times 7,04)*

Енергетски коригована млечност (ЕСМ) је била статистички значајно нижа 7. дана лактације ($p < 0,001$), док је 28. дана показивала тенденцију да буде нижа ($p = 0,06$) у огледној у поређењу са контролном групом. Проенти млечне масти, протеина и лактозе се нису статистички значајно разликовали између група 7. и 28. дана лактације.

Како је лактација одмицала, ЕСМ је статистички значајно расла само у огледној групи док је проценат протеина статистички значајно опадао у обе групе.

5.10. Унос суве материје и оцена телесне кондиције

Суплементација хромом је утицала на ДМI, као и на ВCS током препарталног, али не и током постпарталног периода. ДМI и ВCS су били статистички значајно виши ($p < 0,05$, појединачно) у огледној групи у поређењу са контролом 10. дана пре очекиваног термина тељења (табела 5).

Табела 5. Просечне вредности (средња вредност \pm S.E.) уноса суве материје (ДМI) и оцена телесне кондиције (ВCS) током перипарталног периода код контролне (-Cr) и огледне групе крава (+Cr)

		Дани у односу на тељење			
Параметар	група	-30	-7	7	28
Унос суве материје (ДМI)	-Cr	12,04 \pm 0,42 ^a	10,9 \pm 0,35 ^{b*}	16,7 \pm 0,87 ^b	19,0 \pm 1,12 ^c
	+Cr	12,8 \pm 0,80 ^a	12,1 \pm 0,31 ^a	15,9 \pm 1,34 ^b	19,9 \pm 0,94 ^b
Оцена телесне кондиције (ВCS)	-Cr	2,93 \pm 0,37 ^a	3,28 \pm 0,26 ^{b*}	2,92 \pm 0,14 ^a	2,64 \pm 0,22 ^b
	+Cr	3,06 \pm 0,30 ^{a,b}	3,52 \pm 0,37 ^b	3,04 \pm 0,38 ^b	2,87 \pm 0,19 ^b

Тумачење: а, б, в, г- различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) унутар групе, *- указује на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између контролне(-Cr) и огледне групе (+Cr) у датом периоду

6. ДИСКУСИЈА

6.1. Сигнални пут инсулина

Према нашим сазнањима, приказана студија је прва која процењује ефекат додатог хрома на сигнални пут инсулина код крава. Ефекти хрома на сигнални пут инсулина су до сада углавном описивани код лабораторијских животиња.

Механизми утврђени код других животињских врста се не могу пренети на краве, с обзиром на разлику која постоји у хомеостази енергетског метаболизма између преживара и непреживара посебно током перипарталног периода за који је наша студија и урађена (Sinclair, 2010). Наиме, иако су енергетске потребе повећане током периода ране лактације, метаболички путеви којима се обезбеђује додатна енергија нису исти код свих сисара. Код крава производња млека је подржана обимном мобилизацијом масног ткива (Ingvarsten, 2006), док код других животињских врста постоје другачији механизми обезбеђивања додатне енергије. На пример, глодари значајно смањују термогенезу у мрком масном ткиву (Trauhurn и Richard, 1985). Поред овога постоје и други механизми који подржавају снабдевање глукозом током повећане продукције млека (Sinclair, 2010).

Сви сисари, укључујући и краве, развијају одређени степен инсулинске резистенције током гравидитета чиме се постиже преусмеравање хранљивих материја из инсулин зависних ка инсулин независним ткивима (Holtenius и Holtenius 2007). Услед високе производње млека краве пролазе кроз период смањеног одговора инсулин зависних ткива (мишићно и масно) на инсулин током периода ране лактације (Sarah и сар., 2012; Abuelo и сар., 2016). Додатно, повећана глуконеогенеза је одговорна за повећану синтезу млека током периода ране лактације (Pere и сар., 2000). Ови механизми адаптације су од великог значаја за добро здравље и продуктивност млечних крава, и уколико ови механизми не функционишу на одговарајући начин, краве постају изложене бројним метаболичким обољењима (Ingvarsten, 2006).

Инсулинска резистенција, као модификован инсулински одговор током транзиционог периода, је тема бројних истраживања урађених последњих неколико

година код различитих животињских врста укључујући и краве (Abuelo и сар., 2016). Инсулинска резистенција се углавном представља нумерички, математичким израчунавањима током IVGTT код различитих животињских врста, као што су краве (Oikawa и Oetzel, 2006), коњи (Lacombe и сар., 2014.), свиње (Amoikon и сар., 2000), пси (Irvine и сар., 2002) и лабораторијске животиње (Pacini и сар., 2013). У литератури, највећи број доступних података о инсулинском сигналном путу и инсулинској резистенцији налазимо у истраживањима на лабораторијским животињама (Saltiel и Pessin, 2003). У последње време актуелна су испитивања инсулинског сигналног пута и код крава коришћењем методе PCR, којом се детектује експресија гена за протеине инсулинског сигналног пута (Reverchon и сар., 2014, Liu и сар., 2013) и коришћењем методе Western blot којом се квантификује заступљеност протеина инсулинског сигналног пута (Zachut и сар., 2013, Sprachmann и сар., 2013).

Најзначајнији протеини који су укључени у инсулински одговор у мишићном и масном ткиву и у јетри крава су IR, IRS, АКТ (Reverchon и сар., 2014) као и GLUT4 у мишићном и масном ткиву (Kuhla и сар., 2011). Сигнални молекули за које је доказано да су укључени у интеракцију хрома и инсулинског одговора су IR, IRS, АКТ, GLUT4 али и JNK, AMPK, PI3K, PTP1B, и CD36 у масном ткиву (Chen и сар., 2009).

У нашој студији ћелијски сигнални молекули који су под утицајем хрома показали промену експресије у ткивима крава, као и у студијама изведеним на другим животињским врстама. Добијени резултати на кравама указују да третман хромом модулира одговор ткива на инсулин на нивоу проксималног инсулинског сигналног пута, тј. повећава експресију IR β и pAKT Ser⁴⁷³, а смањује експресију pIRS-1 Ser³⁰⁷. Иако ови одговори ткива нису исти у свим ткивима, под утицајем су третмана хромом као и фазе производног циклуса.

У скелетном мишићном ткиву третман хромом утиче на експресију IR β и pIRS-1 Ser³⁰⁷. У +Cr групи протеинска експресија IR β је статистички значајно повећана 10 дана пре очекиваног термина тељења, док је експресија pIRS-1 Ser³⁰⁷ смањена у оба периода после тељења. Ови резултати су у складу са резултатима добијеним на лабораторијским животињама (Chen и сар., 2009), код којих је третман хромом појачавао инсулински сигнални пут у инсулин зависним ткивима на нивоу pIRS-1-

PI3K-AKT (Hua и сар., 2012). Goldstein и сарадници (2001) су доказали да код лабораторијских животиња хром модулира активност негативних регулатора инсулинског сигналног пута као што је pIRS-1 Ser³⁰⁷. Сви добијени резултати подржавају тезу да хром побољшава инсулински одговор на нивоу скелетног мишићног ткива, повећавањем експресије протеина IR β и смањењем експресије протеина негативних регулатора инсулинског сигналног пута као што је pIRS-1Ser³⁰⁷. Могуће је да је повећање концентрације хромодулина код животиња третираних хромом један од механизма који доводи до оваквог резултата (Vincent, 2004). Наиме, показано је да хромодулин побољшава интеракцију хрома са IR и инхибира фосфорилацију pIRS-1 на Ser³⁰⁷ што последично доводи до повећане транслокације GLUT4 на мембрану ћелије (Chen и сар., 2009). Поред овога, поједини истраживачи су установили да хром активира транслокацију GLUT4 преко холестерол-зависног механизма (Horvath и сар., 2008).

У поткожном масном ткиву није утврђена статистички значајна разлика између група у експресији нити једног испитиваног протеина (IR β , pIRS-1 Ser³⁰⁷, pAKT Ser⁴⁷³, GLUT4), иако је огледна група имала нумерички веће експресије протеина IR β као и GLUT4 у поређењу са контролном групом у свим испитиваним временским тачкама након почетка третмана хромом. Експресија протеина pIRS-1 Ser³⁰⁷ била је нумерички нижа у огледној, у поређењу са контролном групом у узорцима ткива узетим након тељења. Ови резултати указују на то да је код перипарталних крава масно ткиво у поређењу са другим ткивима мање погођено деловањем хрома или да целуларни механизми у вези са деловањем хрома укључују неке друге молекуле. Као и у случају скелетних мишића и код масног ткива је утврђено да хром може да активира транслокацију GLUT4 путем холестерол-зависног механизма (Horvath и сар., 2008). Наши резултати показују да протеинска експресија GLUT4 у масном ткиву расте са повећањем дужине третмана и његова експресија је највећа на крају третмана, а разлика између +Cг и -Cг групе показује тренд значајности (p=0,07).

У ткиву јетре у нашој студији су анализирана три молекула (IR β , pIRS-1 Ser³⁰⁷, pAKT Ser⁴⁷³) због чињенице да се искоришћавање глукозе у хепатоцитима дешава путем инсулин независних GLUT2 транспортера (Thorens, 1996). За разлику од

мишићног ткива, 10 дана пре очекиваног термина тељења хром није имао утицаја на експресију IR β , али је утицао на експресију pIRS-1 Ser³⁰⁷ која је била нижа у огледној групи у поређењу са контролном групом уз постојање статистички значајне разлике. Седмог дана после тељења експресија протеина pAKT Ser⁴⁷³ била је под утицајем третмана хромом. Наши резултати су у складу са резултатима других аутора добијеним на лабораторијским животињама (Hua и сар., 2012).

6.2. IVGTT

Први IVGTT је урађен 28. дана пре очекиваног термина тељења и тада није установљена разлика у параметрима кинетике глукозе и инсулина међусобним поређењем група. Седмог дана пре очекиваног термина тељења када је урађен други IVGTT није утврђено постојање разлика у базалним концентарцијама глукозе између група. Наши резултати су у сагласности са резултатима до којих су у својим истраживањима током препарталног периода дошли Bunting и сарадници (1994) и Chang и Mowat (1992). Додатно, хром није утицао на кинетику глукозе током IVGTT, која је такође испитивана у студијама урађеним на кравама (Bunting и сар., 1994, Hayirli и сар., 2001). Samuel и Shulman (2012) су нагласили да k вредност (стопа клиренса егзогене глукозе) у комбинацији са параметрима кинетике инсулина даје веома значајну информацију која је повезана са инсулинским одговором. Код крава третираних хромом, k вредност може бити снижена (Hayirli и сар., 2001) или повишена (Bunting и сар., 1994). Разлике у клиренсу глукозе под утицајем хрома могле би да буду последица разлике у врсти животиња, старости као и разлике од коришћених интервала израчунавања (15.-45. минута или 15.-30. минута). У нашој студији хром није имао утицаја на k вредност. Током истог периода (7 дана пре очекиваног термина тељења) хром је показао значајан ефекат на кинетику инсулина, јер су INS_{peak} , ΔMAX_{ins} и AUC_{ins} били значајно нижи у огледној групи током IVGTT. Добијени резултати су у сагласности са резултатима Stahlhut-а и сарадника (2006). Subiyatno и сарадници (1996) су утврдили повећану инсулинску сензитивност код крава третираних хромом две недеље пре тељења, али само код јуница, не и у старијих крава. У појединим студијама хром није утицао на кинетику инсулина (Bryan и сар., 2004).

Наши резултати везани за кинетику инсулина сугеришу да су ткива огледне групе крава инсулин сензитивнија, што је такође потврђено резултатима добијеним на нивоу мишићног ткива у истом периоду истраживања. Иако RQUICKI вредности нису потврдиле значајну разлику у инсулинској сензитивности између група, смањено ослобађање инсулина без промена у вредности k могу указивати на повећану инсулинску сензитивност како предлажу Spears и сарадници (2010). Додатно, RQUICKI вредност је нумерички била већа код огледне групе што указује на повећану сензитивност како су предложили Holtenius и Holtenius (2007). Повећана инсулинска сензитивност у хром третираној групи крава је претходно била утврђена у студијама на кравама (Subiyatno и сар., 1996). Генерално посматрано, како предлажу Spears и сарадници (2010), смањено ослобађање инсулина (ниже концентрације инсулина комбиновано са изостанком промене k вредности) могу указивати на повећану инсулинску сензитивност. Бројни аутори (Horvath и сар., 2008, Chen и сар., 2009) су објаснили да додати хром смањује потребе ткива за инсулином, с обзиром на то да олакшава искоришћавање глукозе у инсулин сензитивним ткивима. Добро је познато да гравидне краве имају веће потребе за инсулином услед интензивнијег метаболизма и повећаног степена коришћења глукозе у ткивима (Sano и сар., 1991). Може се претпоставити да хром који је додат гравидним кравама појачава утицај инсулина на периферна ткива доводећи до повећаног искоришћавања глукозе у мишићном и масном ткиву. Ово је потврђено и у истраживањима других аутора (McNamara и Valdez, 2005). Може се претпоставити да је доступна глукоза у огледној групи пре тељења преусмерена из хепатичног ткива, у коме је требало да буде искоришћена за синтезу гликогена, ка периферним ткивима.

Снабдевање организма хромом може повећати унос глукозе од стране инсулин зависних ткива што је у случају нашег огледа довело до уласка глукозе у ткива уместо да се вишак глукозе депонује у облику гликогена. Ово се може потврдити резултатима добијеним на молекуларном нивоу, с обзиром да је третирана група крава имала статистички значајно већу експресију $IR\beta$ у мишићном и масном ткиву 10 дана пре очекиваног трермина тељења, али ови резултати нису примећени у ткиву јетре. Неопходно је поменути да су повећане концентрације инсулина установљене код

засушених нетретираних крава могле имати позитиван ефекат на целокупни метаболизам с обзиром да инсулин доводи до складиштења глукозе у форми гликогена активацијом ензима јетре који су укључени у синтезу гликогена (Kuhla и сар., 2011, Nayirli, 2006). И поред бројних података који сугеришу ефекте хрома на инсулинску сензитивност, поједини аутори нису утврдили промене у инсулинском одговору крава третираних хромом (Вруан и сар., 2004). Разлике у добијеним резултатима објављеним од стране различитих аутора могу се објаснити не само постојањем разлика у раси крава већ и обликом хрома коришћеног у истраживањима као и типом исхране (Pechova и Pavlata, 2007).

Неочекивано 10. дана после тељења третман хромом није имао исти ефекат на кинетику глукозе и инсулина као пре тељења. За разлику од резултата 7 дана пре очекиваног термина тељења, секреција инсулина током IVGTT била је израженија у поређењу са огледном групом крава 10. дана после тељења. Bunting и сарадници (1994) су добили сличан налаз и утврдили су да суплементација хромом доводи до повећања концентрације инсулина у циркулацији. Слични резултати су представљени и у истраживањима које су објавили Bunting и сарадници (1994), који су утврдили повећано ослобађање инсулина код хромом третираних младих бикова. Subiyatno и сарадници (1996) су такође указали на смањену инсулинску сензитивност код јуница третираних хромом две недеље после тељења. Ово очигледно повећање резистенције на инсулин је супротно ефектима које је додати хром показао током препарталног периода и који смо очекивали да се настави и током постпарталног периода. Ови резултати који су у супротности са резултатима добијеним пре тељења могу се објаснити ефектом хрома на хормоналну осовину која се активира након тељења (Sadri и сар., 2012), и која може да провоцира настанак инсулинске резистенције периферних ткива. На пример, повећана инсулинска резистенција хромом третираних крава могла би бити последица утицаја повишених вредности IGF-I у циркулацији у одговору на инсулин (Okere и Hacker, 1995). Као што је представио Subiyatno и сарадници (1996) IGF-I се може узети за IR у периферним ткивима и не мора нужно да спроводи своје биолошке ефекте.

Повећана секреција инсулина у огледној групи може бити у вези са смањеном продукцијом млека услед добро познате везе између лучења млека и секреције инсулина код високомлечних крава (Douglas и сар., 2016).

6.3. Биохемијски параметри крви

Перипартални период прате значајне промене у енергетском метаболизму крава и оне су тада најизложеније метаболичком стресу. Иако се краве налазе под сличним условима гајења у фармским условима, концентрације биохемијских параметара и хормона у циркулацији значајно варирају током постпарталног периода што указује на то да се способност одупирања насталом метаболичком стресу, који је последица NEB, значајно разликује између појединих крава (Sundrum, 2015, Kessel и сар., 2008). У циркулацији смо пратили промене појединих метаболита под утицајем хрома. Одређивање метаболичког профила, којим се утврђују промене у вредностима појединих биохемијских параметара крви, омогућава процену здравственог стања, али даје и могућност правовремене дијагностике метаболичких обољења (Calamari и сар., 2016)

6.3.1. Показатељи енергетског статуса

Од показатеља енергетског статуса коришћени су следећи параметри: глукоза, NEFA и BHBA.

6.3.1.1. Глукоза

Глукоза представља важан извор енергије за високомлечне краве, с обзиром да код њих постоје повећани захтеви за синтезом лактозе млека током лактације. Постпартална хипогликемија је последица појачаног коришћења глукозе за синтезу лактозе млека (Nale, 2003). Концентрације глукозе у циркулацији су подложне изразитој хомеостатској регулацији, па због тога не представљају нарочито поуздан параметар енергетског статуса (Reynolds и сар., 2003).

Због појачаних захтева за глукозом после тељења, а за потребе синтезе лактозе млека, у обе групе крава примећено је смањене концентрација глукозе након тељења.

У огледној групи је то смањење било значајно само поређењем са периодом 7 дана пре тељења. Поред тога, познато је да глукоза, посредством утицаја на концентрацију инсулина, контролише концентрације NEFA и ВНВА у циркулацији. (Lucy, 2016)

Концентрација глукозе код преживара под утицајем хрома није била значајно промењена у истраживањима већине аутора који су се бавили овом проблематиком (Spears и сар., 2012, Nikkha и сар., 2011, Hayirli и сар., 2001). Међутим, Sumner и сарадници (2007) су утврдили повећање концентрација глукозе код крава третираних хромом.

6.3.1.2. NEFA

Основни извор NEFA у циркулацији крава су триглицериди који су депоновани у масном ткиву (Adewuyi и сар., 2005), а који се ослобађају и представљају извор енергије у условима NEB који је карактеристичан за почетак лактације. Концентрације NEFA у крви се могу користити за процену енергетског биланса (Oetzel, 2008). У нашим истраживањима концентрације NEFA биле су ниже пре тељења.

Базалне вредности NEFA су биле статистички значајно ниже, а унос суве материје и оцена телесне кондиције значајно виши, 7 дана пре очекиваног термина тељења у хромом третираној у односу на контролну групу, што указује на смањену липидну мобилизацију код третираних крава. Слична студија на овцама (Kitchlong, 1995), кравама (Hayirli, 2001) и прасадима (Amoikon, 1995) показује смањење концентрације NEFA у циркулацији под утицајем додатог хрома. Ови резултати су у сагласности са резултатима које су објавили Hayirli и сарадници (2001). Bunting и сарадници (1994), који су испитивали утицај хром пиколината на метаболизам, нису запазили да хром има утицај на нивое NEFA код телади. Смањење концентрације NEFA у циркулацији као одговор на хром може делимично бити последица смањеног нивоа кортизола у циркулацији (Almeida и Barajas, 2001) с обзиром да хром делује антагонистички у односу на инсулин смањујући унос глукозе од стране периферних ткива (Burton, 1995). Хром пропионат у истраживањима McNamara и Valdez-a (2005) је повећао стопу липогенезе препартално, када су краве биле у позитивном билансу енергије. После тељења, краве које су добијале хром, имале су очекивано смањење

липогенезе и појачану липолизу. Наши резултати концентрације NEFA у организму 10. дана после тељења код хромом третираних крава су показали да третман хромом провоцира липомобилизацију за разлику од његовог ефекта на липомобилизацију 7. дана пре очекиваног термина тељења. До сличних резултата су дошли и McNamara и Valdez (2005) који су показали да хромом третиране краве у лактацији које су у стадијуму NEB показују смањену липогенезу и појачану липолизу. Могуће објашњење ових резултата је да преусмеравање глукозе у инсулин сензитивна ткива током периода засушења доводи до неадекватне адаптације крава на лактацију с обзиром на недостатак депоа гликогена у јетри. Иако нисмо мерили тежину телади на рођењу, постоји могућност да хром који је прошао кроз плаценту (Wallach и Verch 1987) повећава искоришћавање глукозе од стране фетуса и преусмерава глукозу до феталних ткива. У сваком случају пуерпералне краве у нашој студији нису имале одговарајуће енергетске изворе за превазилажење иницијалног NEB који је типичан за тек отељене краве. Ово мишљење може бити подржано резултатима добијеним за принос млека с обзиром да су огледне краве имале значајно нижу млечност све до 14. недеље лактације што би могло бити последица процеса који је горе објашњен.

Месец дана након тељења, односно 55. дана од почетка давања хрома, енергетски метаболизам хромом третираних крава био је опет побољшан. Искоришћавање глукозе у огледној групи крава било је олакшано у поређењу са контролном групом. Липомобилизација је била значајно нижа и инсулински одговор је достигао свој плато између 15. и 30. минута. Олакшано искоришћавање глукозе код третираних крава је у сагласности са резултатима добијеним за експресију GLUT4 која је била повишена у огледној групи у масном ткиву. Показано је да у случају повишене концентрације глукозе, што је посматрано и у нашој студији, код третираних крава је инсулин појачао искоришћавање глукозе која је водила редистрибуцији GLUT4 из ћелијских депоа на плазма мембрану (Saletil и Pessin, 2003). McNamara и Valdez (2005) су показали да хромом третиране краве 56. дана лактације имају израженији апетит и липогенезу за разлику од контролне групе крава. Стога, смањено ослобађање NEFA месец дана након тељења може бити последица појачане липогенезе.

6.3.1.3. ВНВА

ВНВА је кетонско тело које настаје у јетри као последица непотпуне оксидације масних киселина код преживара (Purpel и сар., 2016), код којих због ниских концентрација глукозе кетогенеза представља део допунског енергетског метаболизма. ВНВА је преовладавајуће кетонско тело које служи као алтернативни извор енергије у условима смањене концентрације глукозе, а благи пораст његових концентрација је део физиолошког одговора у току прилагођавања на НЕВ (McArt и сар., 2013). У нашој студији је након тељења утврђено повећање концентрације ВНВА као последица смањеног уноса суве материје која је довело до НЕВ, али које није било статистички значајно.

У нашем истраживању хром није имао утицај на концентрацију ВНВА. Овај резултат је у сагласности са радовима Науџли и сарадника (2001) и Nikkha и сарадника (2011). Међутим, Yang и сарадници (1996) су утврдили смањење концентрација ВНВА под утицајем хрома. Ниже концентрације ВНВА након суплементације хромом би могле бити последица појачане глуконеогенезе (Sano и сар., 1996, Subiyatno и сар., 1996).

Антикетогени ефекти хрома су потврђени и у појединим студијама Besong и сар., (1996), који су утврдили смањену учесталост појаве кетозе код крава којима је перорално апликован хром током перипарталног периода. С друге стране (Smith и сар., 2005, Yang и сар., 1996, Chang и сар., 1996) нису утврдили смањење концентрације ВНВА у крви крава које су перорално добијале препарат хрома.

6.3.2. Показатељи протеинског статуса

Од показатеља протеинског статуса испитани су следећи параметри: укупни протеини, албумин и уреа.

6.3.2.1. Укупни протеини

Концентрација укупних протеина у крви представља је један од показатеља метаболизма азота. Она се разликује у зависности од узраста животиње, фазе лактације и сезоне (Onita и Colibar, 2009). Перипартални период код бројних врста животиња и људи је праћен метаболичким променама, које се одражавају и на концентрацију биохемијских параметара у циркулацији укључујући и параметре који су везани за метаболизам протеина (Tothova и сар., 2018).

Познато је да је хром укључен у метаболизам протеина (Sahin и сар., 2002). Суплементација хромом у нашем истраживању је довела до повећања концентрације протеина 30. дана после тељења (56. дана давања хрома), иако повећање није било статистички значајно. До сличних резултата у својим истраживањима су дошли и Bunting и сарадници (1994) и Chang и Mowat (1992). Добијени резултат се може објаснити смањењем концентрације кортизола у циркулацији или повећањем инсулинске сензитивности, узимајући у обзир чињеницу да инсулин утиче на повећану синтезу протеина (Fujita и сар., 2006).

Evans и Bowman (1992), Kitchalong и сарадници (1995), Kegley и сарадници (1997a), Bunting и сарадници (2000) и Nikkha и сарадници (2011) у својим истраживањима везаним за додавање хрома у исхрани људи и животиња нису утврдили утицај хрома на концентрацију укупних протеина.

6.3.2.2. Албумин

Албумини се синтетишу у јетри и неопходни су за транспорт различитих метаболита (NRC, 2001). Moonsie-Shageer и Mowat (1993) су у својим истраживањима утицаја хрома на метаболичке параметре приметили повећање концентрације албумина у крви телади.

Повећане концентрације албумина у циркулацији могу бити последица појачане синтезе аминокиселина у јетри, као последица утицаја хрома, посредством инсулина, на побољшње синтезе аминокиселина у јетри. Наиме, Schroeder и сарадници (1965) су утврдили да хром, заједно са инсулином, побољшава уградњу неких аминокиселина у протеине.

Lindemann и сарадници (1995) радећи са свињама и Forbes и сарадници (1998) радећи са овцама нису установили промене у концентрацији албумина под утицајем додатог хрома.

Pechova и сар. (2002) су у својим истраживањима добили резултате који су у супротности са нашим. Наиме, у њиховом истраживању, након суплементације органски везаног хрома у квасцу, дошло је до пораста концентрације албумина у крви третираних крава. У истраживањима Nikkha и сарадници (2011) и Targhibi и сарадници (2011), хром метионин је довео до повећања концентрације албумина у циркулацији код третиране групе крава.

6.3.2.3. Уреа

Уреа настаје као производ разлагања протеина и њена концентрација у циркулацији директно одражава метаболизам протеина (Butler, 1998). У складу са тим у нашој студији је утврђен пораст концентрације урее после тељења.

У истраживањима Kitchalong и сарадника (1995), Bunting и сарадика (2000), Pechova и сарадника (2002), Nikkha и сарадника (2011) и Targhibi и сарадника (2011) додати хром није утицао на концентрацију урее у циркулацији код крава.

6.3.3. Показатељи липидног статуса

Метаболизам липида има изразити значај у прилагођавању метаболизма током транзиционог периода (Gross и сар., 2013) и обезбеђивању енергије током NEB.

Од показатеља липидног статуса коришћени су следећи параметри: холестерол и TG.

6.3.3.1. Холестерол и TG

Ниже концентрације холестерола у периоду пре тељења се доводе у директну везу са искоришћавањем холестерола за синтезу стероидних хормона у јајницима и постелици (Cupps, 1991), док се након тељења холестерол користи у синтези млечне масти (Cupps, 1991).

Холестерол је неопходан у синтези стероидних хормона па се његове ниске концентрације у циркулацији могу повезати са поремећајима репродуктивних функција (Williams, 1994).

Холестерол се ствара у јетри, а из организма се елиминише као жучна киселина. Осим овога има улогу прекурсора стероидних хормона и витамина D. Концентрације холестерола су ниске на дан тељења, а затим постепено расту током прве недеље после тељења (van Knegsel и сар., 2007). У обе групе крава концентрације холестерола су биле значајно ниже у периодима око тељења, иако статистичка значајност разлике није утврђена између група.

Претходна истраживања (Besong и сар., 1996, Depew и сар., 1998, Kegly и сар., 1997b и Moonsieshageer и Mowat., 1993, Nikkhal и сар., 2011, Nayirli и сар., 2001) су показала да хром нема утицаја на концентрацију холестерола и TG. С друге стране у истраживањима Page и сарадника (1993), Bunting и сарадника (1994), Halдар и сарадника (2009) и Biswas и сарадника (2006) утврђено је да хром доводи до смањења концентрација укупног холестерола и TG. Разлог нижим концентрацијама укупног холестерола и TG може бити и резултат активности инсулина који утиче на пораст липогенезе и смањење липолизе код крава третираних хромом (Spears, 1999).

Испитивањем ефекта додавања хрома у исхрану људи Anderson (1995) је показао да хром повећава концентрације HDL холестерола и смањује концентрацију TG и укупног холестерола. Истраживање Zima и сарадника (1998) је показало да хром смањује концентрацију холестерола у циркулацији онемогућавајући активност хепатичног ензима хидрокси метил глутарил Со-А редуктазе.

6.3.4. Показатељи функционалог стања јетре

Од показатеља функционалног стања јетре коришћени су следећи параметри: ТВ, АСТ, GGT.

6.3.4.1. ТВ

Концентрација ТВ је показатељ функционалног стања јетре (Cornelius, 1980), а овај параметар се користи и у процени енергетског статуса високомлечних крава (Продановић и сар., 2010).

Промену концентрације ТВ под утицајем хрома додатог у храну пратио је мали број истраживача. У нашем истраживању хром није имао утицај на концентрацију ТВ, док су у истраживањима Resnova и сарадника (2002) концентрације ТВ биле значајно ниже друге недеље после тељења.

6.3.4.2. АСТ

АСТ је ензим смештен у цитоплазми и митохондријама хепатоцита и скелетних мишића па се не сматра специфичним показатељем функције јетре (Elitok и сар., 2006). АСТ се користи као показатељ оштећења ћелија јетре и хепатичне липидозе (Vobe и сар., 2004).

Ниска активност је забележена код здравих животиња, а код крава активност АСТ расте у периоду око тељења (Cavestany и сар., 2005).

Промену активности овог ензима под утицајем перорално додатог хрома је пратио незнатан број истраживача. Значајно смањење активности АСТ у периоду после тељења (3. и 5. недеље) је показано у огледу Resnova и сарадника (2002) који су користили хром пореклом из квасца и давали перорално у перипарталном периоду. Овај резултат је у супротности са нашим резултатом, иако је у истраживањима Resnova и сарадника (2002) 40 % крава које су добијале хром органски везан у квасцу током перипарталног периода и 90 % контролних крава имало значајно повећање каталитичке активности АСТ у периоду након тељења.

6.3.4.3. GGT

GGT је мембрански везан ензим који се налази се у јетри, бубрезима, епителу танких црева и мозгу. Повишена активност GGT користан је показатељ у идентификацији животиња са оштећењем јетре (Cornelius, 1980). Његова активност је релативно висока у јетри крава, коња, оваца и коза (Tenant, 1997).

Тридесетог дана после тељења утврђено је значајно смањење активности GGT у нашем истраживању. Промену активности овог ензима под утицајем перорално додатог хрома је пратио незнатан број истраживача. Pechova и сарадници (2002) пријављују пролазно повећање активности GGT само код 2 од 10 испитиваних крава које су добиле хром за разлику од контролне групе крава у истом истраживању код којих је била повећана каталитичка активност ензима код 4 животиње од 2. до 6. недеље после тељења.

6.3.5. Показатељи минералног стауса

Од показатеља минералног стауса испитани су следећи параметри: Mg, Ca, P

У литератури се појављује релативно мали број радова везаних за утицај хрома на метаболизам других минерала.

У нашој студији нису утврђене статистички значајне разлике у ефекту додатог хрома на концентрације испитиваних минерала (Mg, Ca, P). Овај резултат је у сагласности са претходно добијеним резултатом Pechova и Pavlata (2002). Такође, хром није показао утицај на концентрације Ca и P у циркулацији огледне групе крава у истраживањима Targhibi и сарадника (2012) и Pechovai сарадника (2002).

Moonsie-Shageer и Mowat (1993), који су пратили утицај различитих доза перорално додатог хрома органски везаног у квасцу на биохемијске параметре и инсулински статус телади утврдили су да је додати хром утицао на повећање концентрација Ca и Mg само 7. дана истраживања.

6.4. Хормонални статус

Од хормона су испитивани инсулин и кортизол.

6.4.1. Инсулин

Инсулин има важну улогу у контроли метаболизма угљених хидрата, протеина и масти. Поједина истраживања су потврдила да хром утиче на концентрације инсулина у циркулацији, па је стога било занимљиво упоредити концентрације инсулина током пероралног давања хрома органски везаног у квасцу код обе испитиване групе крава и утврдити утицај хрома на концентрације овог хормона у крви.

У нашем истраживању хром није утицао на концентрације инсулина у крви испитиваних крава. Овај резултат је у сагласности са истраживањима Spears и сарадника (2012). Међутим, у истраживањима Nikkhañ и сарадника (2011) и Sumner и сарадника (2007) под утицајем хрома дошло је до снижавања концентрација инсулина у циркулацији.

6.4.2. Кортизол

Кортизол је катаболички хормон који повећава доступност супстрата (глукозе, масних киселина и аминокиселина) из ендогених складишта. У истраживањима код људи је потврђена улога кортизола у настанку инсулинске резистенције (Dinneen и сар., 1993). До сада у литератури не постоји усаглашено мишљење о томе на који начин хром утиче на секрецију кортизола, али је познато да глукокортикостероиди инхибирају екскрецију инсулина (Munick и сар., 1984). Истраживања урађена код људи и лабораторијских животиња указују да различити стресори повећавају уринарни губитак хрома (Mowat, 1994) као и да појачавају секрецију кортизола. Бројне студије су потврдиле смањење концентрација кортизола код преживара под утицајем додатог хрома (Chang и Mowat, 1992, Moonsie-Shageer и Mowat, 1993, Mowat и сар., 1993, Burton и сар., 1994, Mallard и сар., 1994, Chang и сар., 1996, Haldar и сар., 2006, Pechova

и сар., 2002с). Суплементација хромом није имала утицај на ниво кортизола у серуму у студијама Kegley и сарадника (1997) и Nikkha и сарадника (2011).

Други аутори нису испитивали вредност кортизола у серуму након примене хрома Дерев и сарадници (1998) и Kegley и сарадници (1997b). Дерев и сарадници (1998) су пратили метаболички одговор телади којима је додаван хром најпре у замену за млеко а онда и у стартер, док су Kegley и сарадници (1997b) пратили имунски одговор и отпорност на болести под утицајем стреса који је проузрокован транспортом.

У нашем истраживању хром је утицао на ниже концентрације кортизола у циркулацији, а поређењем група је примећена статистички значајна разлика 7. дана пре очекиваног термина тељења као и 30. дана после тељења

6.5. Млечност и хемијски састав млека

У нашој студији смо утврдили да третман хромом изазива смањење млечности у огледној групи крва. Добијени резултати су у супротности са резултатима до којих су дошли Nayirli и сарадници (2001) и Nikkha и сарадници (2011) који су утврдили да хром доводи до повећања млечности код третираних крва.

Литературни подаци за краве су различити у погледу утицаја хрома на млечност. Вруан и сарадници (2004) као и Subyatno и сарадници (1996) нису утврдили ефекат хрома на млечност. Поред објашњења механизма смањене млечности у нашем експерименту које смо раније поменули постоји могућност да различити извори органског хрома имају различити утицај на млечност. Хром пропионат би могао имати позитиван ефекат на млечност обзиром да се пропионат користи као прекурсор за глуконеогенезу и може повећати концентрације глукозе у циркулацији која се може искористити за синтезу лактозе млека (McNamara и Valdez, 2005). Могуће је да хром органски вазан у квасцу може повећати стварање млека у условима када је његова доза усклађена са производњом млека. Већа продукција млека у контролној групи животиња се може објаснити нижом концентрацијом глукозе у серуму, јер се глукоза искористила за синтезу лактозе (Stahlhut, 2005). У нашем истраживању могућа објашњења смањеног стварања млека у огледној групи крва би могла бити у вези са измењеним

инсулинским сигналним путем и последично са промењеним метаболизмом глукозе код тих крава. Релативно мали број аутора је пратио састав млека под утицајем додатог хрома.

Вгуан и сарадници (2004) и Subiyatno и сарадници (1996) су утврдили да хром није имао утицај на састав млека у поређењу са контролом. У нашој студији није постојала разлика између контролне и огледне групе у односу на састав млека, што је у сагласности са резултатима других аутора (Besong и сар., 1996, Yang и сар., 1996, Simek и сар., 1999, Smith и сар., 2005 и McNamara и Valdez, 2005). Једино су Hayirli и сарадници (2001) утврдили повећање количине млечне масти и концентрације лактозе у млеку након суплементације хромом.

7. ЗАКЉУЧЦИ

1. Перорално апликовани хром је, у мишићном ткиву, изазвао значајно повећање заступљености инсулинских рецептора ($IR\beta$) 10. дана пре очекиваног термина тељења, као и значајно смањење садржаја pIRS-1 Ser³⁰⁷ у оба периода испитивања после тељења, док није имао утицаја на садржај pAKT Ser⁴⁷³ и GLUT4. У субкутаном масном ткиву апликовани хром није остварио статистички значајан ефекат на испитиване молекуле инсулинског сигналног пута, док је у јетри изазвао значајно смањење садржаја pIRS-1 Ser³⁰⁷ 10. дана пре тељења, а значајно повећање pAKT Ser⁴⁷³ 7. дана после тељења.

2. Резултати добијени у IVGTT су у складу са налазима у периферним ткивима и јетри крава на молекуларном нивоу и заједнички иду у прилог закључку да су ткива групе крава којој је апликован хром инсулин сензитивнија и да се глукоза значајно боље користи у мишићном ткиву тих крава. Од параметара кинетике глукозе који доприносе овом закључку су значајно ниже вредности AUC_{glu} код групе која је примила хром, а од параметара кинетике инсулина значајно ниже вредности INS_{peak} , ΔMAX_{ins} као и AUC_{ins} 7. дана пре очекиваног термина тељења, односно значајно више вредности 10. дана после тељења. Иако RQU ISKI вредности нису потврдиле значајну разлику у инсулинској сензитивности између група, смањено ослобађање инсулина после тељења комбиновано са изостанком у промени k вредности могу указивати на повећану инсулинску сензитивност у групи крава којој је апликован хром.

3. Концентрације кортизола су статистички значајно снижене под утицајем апликованог хрома 7. дана пре очекиваног термина тељења као и 30. дана после тељења, указујући на могући ефекат хрома на ублажавање стреса током перипарталног периода.

4. Код крава којима је апликован хром, унос суве материје и оцена телесне кондиције су били значајно већи само током препарталног периода, указујући на преусмеравање енергетског метаболизма ка депоновању хранљивих материја у периферна ткива.

5. Просечна млечност и ЕСМ код крава којима је апликован хром била је значајно нижа током периода ране лактације. Смањена млечност је вероватно последица преусмеравања глукозе ка периферним ткивима уместо у млечну жлезду где се користи за синтезу лактозе, а тиме повећање млечности.

8. ЛІТЕРАТУРА

1. Abe H, Kawakita Y, Hodate K, Saito M (2001) Postnatal development of glucose transporter protein in bovine skeletal muscle and adipose tissue, *J Vet Med Sci*, 63: 1071-75.
2. Abuelo A, Hernandez J, Benedito JL, Castillo C (2016) Association of oxidative status and insulin sensitivity in periparturient dairy cattle: an observational study. *Anim Physiol Anim Nutr* 100, 279–86.
3. Adewuyi AA, Gruys E, Van Eerdenburg FJ (2005) Non-esterified fatty acids in dairy cattle. A review. *Vet Q*, 27: 117-126.
4. Agnew RE, Yan T. (2000) Impact of recent research on energy feeding systems for dairy cattle *Livest Prod Sci*, 66 (2000), 197-215.
5. Allen MS, Bradford BJ, Harvatine KJ (2005) The cow as a model to study food intake regulation. *Ann. Rev. Nutr.* 25: 523-47.
6. Almeida L, Barajas R (2001). Effect of Cr-methionine level supplementation on immune response of bull calves recently arrived to feedlot. *J. Anim. Sci.*, 79: 1-390.
7. Al-Trad B, Reisberg K, Wittek T, Penner GB, Alkaassem A, Gabel G, Furll M, Aschenbach JR (2009) Increasing intravenous infusions of glucose improve body condition but not lactation performance in mid lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92: 5645–5658.
8. Amoikon EK, Fernandez JM, Southern LL, Thompson DLJ, Ward TL, Olcott BM (1995) Effect of chromium tripicolinate on growth, glucose tolerance, insulin sensitivity, plasma metabolites, and growth hormone in pigs, *J. Anim. Sci*, 73:1123–30.
9. Amata IA (2013) Chromium in Livestock Nutrition: A Review *Glo. Adv. Res, J. Agric. Sci*, Vol. 2(12) 289-306.
10. Amoikon EK, Fernandez JM, Southern LL, Thompson DLJ, Ward TL, Olcott BM (1995) Effect of chromium tripicolinate on growth, glucose tolerance, insulin sensitivity, plasma metabolites, and growth hormone in pigs, *J. Anim. Sci*, 73:1123–30.
11. Anderson RA, Polansky MM, Bryden NA (1983) Effects of chromium supplementation on urinary Cr excretion of human subjects and correlation of Cr excretion with selected clinical parameters. *J Nutr*;113:276–281.

12. Anderson RA (1987) Chromium in tissues and fluids. Page 225 in Trace Elements in Human and Animal Nutrition. 5th ed. Academic Press, San Diego, CA.
13. Anderson RA (1995) Chromium and parenteral nutrition. *Nutrition*. 11:83-86.
14. Anderson RA (1997) Nutritional factors influencing the glucose/insulin system: chromium. *J Am Coll Nutr* 16:404–410.
15. Anderson RA (1998) Chromium, glucose tolerance and diabetes. *J Am Coll Nutr* 17:548-55
16. Anderson RA (2000) Chromium in the prevention and control of diabetes, *Diabetes-metab res*, 26, 22–27.
17. Anderson RA (2003) Chromium and Insulin resistance. *Nutr Res. Rev.* 16: 267- 75.
18. An-Qiang L, Zhi-Sheng W, An-Guo Z (2009) Effect of chromium picolinate supplementation on early lactation performance, rectal temperatures, respiration rates and plasma biochemical response of Holstein cows under heat stress. *Pak.J. Nutr.* 8:940-945.
19. Aschenbach JR, Kristensen DN, Donkin SS, Hammon HM, Penner B.(2010) Gluconeogenesis in dairy cows: the secret of making sweet milk from sour dough. *IUBMB Life*. 62:869-77.
20. Avudainayagam S, Megharaj M, Owens G, Kookana RS, Chittleborough D, Naidu R (2003) Chemistry of chromium in soils with emphasis on tannery waste sites, *Rev Environ Contam Toxicol*. 178: 53-91.
21. Babula P, Adam V, Opatrilova R, Zehnalek J, Havel L, Kizek R (2008) Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. *Environ. Chem. Lett.*, 6, 189–13.
22. Barceloux DG (1999) Chromium. *J Toxicol Clin Toxicol*. 1999;37(2):173-94.
23. Barthel A, Schmoll D, Kruger KD, Bahrenberg G, Walther R, Roth RA et al. (2001). Differential regulation of endogenous glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by the forkhead transcription factor FKHR in H4IIE-hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 285: 897–902.
24. Bauman DE Davis CL (1974) Biosynthesis of milk fat. In: *Lactation: A comprehensive Treatise*. vol. 2. Edited by B.L. Larson and V.R. Smith. New York: Academic, pp. 31-75.

25. Bauman DE, Currie WB (1980) Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J Dairy Sci* 63: 1514–1529.
26. Bauman DE (2000) Ruminant Physiology digestion, metabolism, growth and reproduction. Vol. 18. CABI Publishing; New York: 2000. p. 331.
27. Bauman (2000) Regulation of nutrient partitioning during lactation: homeostasis and homeorhesis revisited. In: Cronje PB, ed. Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction. New York: Commonwealth Agricultural Bureau International; 311–328.
28. Bauman DE, Griinari JM (2003) Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annual Review of Nutrition*; 23: 203-227.
29. Beever DE, Cammell SB, Sutton JD, Rowe N, Perrott GE (1998) Energy metabolism in high yielding cows. In: Proceedings of the British Society of Animal Science, Penicuik: 13.
30. Bell AW, Bauman DE (1994) Animal Models for the Study of Adipose Regulation in Pregnancy and Lactation. In: Allen L., King J., Lönnerdal B. (eds) Nutrient Regulation during Pregnancy, Lactation, and Infant Growth. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 352. Springer, Boston, MA.
31. Bell AW (1995) Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science* 1995; 73: 2804-2819.
32. Bergman RN, Miller RE (1974) Direct enhancement of insulin secretion by vagal stimulation of the isolated pancreas *Am. J. Physiol.* 225 (2) 481-86.
33. Bergman EN (1990) Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol. Rev.* 70:567–90.
34. Berne RM, Levy MN (1993) Hormones of the pancreatic islets. *Physiology*, 3rd edn, (Mosby Year Book, St Louis, MO), 851–75.
35. Besong SA (1996) Influence of supplemental chromium picolinate on the concentrations of hepatic tryglyceride and blood metabolites in dairy cattle. Ph. D. Thesis, Kentucky Univ., Lexington.
36. Biswas G., Guha M., Avadhani NG (2005) Mitochondria-to-nucleus stress signaling in mammalian cells: nature of nuclear gene targets, transcription regulation, and induced resistance to apoptosis. *Gene*. 2005;354:132–139

37. Blank MS, Chan JSD, Friesen HG (1977) Placental lactogens, new developments. *J Steroid Biochem* 8:403–414.
38. Bobe G, Young JW, Beitz DC (2004) Invited review: Pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *J Dairy Sci.* 87, 3105–24.
39. Boden G (1996) Fuel metabolism in pregnancy and in gestational diabetes. *Obstet Gynecol North Am* 1996, 23:1–10.
40. Borel JS, Anderson RA (1984) Chromium. In: Frieden E, editor. *Biochemistry of the essential ultrace elements*. New York: Plenum Press, 175-99
41. Borel, JS, Majerus, TC, Polansky MM, Mozer PB, Anderson RA (1984) Chromium intake and urinary Cr excretion of trauma patients. *Biol. Trace Elem. Res.* 6:317.
42. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR (2014) Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014 Jan 1;6(1).
43. Brock JH, Transferrins. (1985) In: Harrison PM, editor. *Metalloproteins*. Vol 2. London: MacMillan, 1985;183-62.
44. Brockman RP (2005) Glucose and short-chain fatty acid metabolism Dijkstra J., Forbes, JM, France J.(Eds.), *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*, CABI Publishing, Cambridge, pp. 291-310.
45. Brockman RP (1984) Validation of equation for calculation of glucose appearance during nonsteady state in sheep. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 62:341–44.
46. Brockman RP, Manns JG (1974) Effects of glucagon on activities of hepatic enzymes in sheep. *Cornell Veterinarian* 64, 217-24.
47. Brockman RP (1978) Roles of glucagon and insulin in the regulation of metabolism in ruminants. *Canadian Veterinary Journal*, 19: 55–62.
48. Brockman RP (1979) Roles for insulin and glucagon in the development of ruminant ketosis. *Canadian Veterinary Journal*, 20: 121–126.
49. Brockman RP, Laarveld B. (1986) Hormonal regulation of metabolism in ruminants a review. *Livestock Prod. Sci.* 14, 313–34.
50. Bryan MA, Socha MT, Tomlinson DJ (2004) Supplementing intensively grazed late-gestation and early lactation dairy cattle with chromium. *J Dairy Sci* 87, 4269–4277.

51. Bunting LD, Fernandez JM, Thompson DL, Southern LL (1994) Influence of chromium picolinate on glucose usage and metabolic criteria in growing Holstein calves. *J Dairy Sci.* 72, 1591–1599.
52. Burks DJ, White MF (2001) IRS proteins and beta-cell function. *Diab.*;50 Suppl 1: S140-145
53. Burton J, Mc Bride LBW, Block E, Glimm DR, Kenelly JJ (1994) A review of bovine growth hormone, *Canadian J. Anim. Sci.*74:167-201.
54. Butler WR, Smith RD (1989) Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 72:767-783.
55. Cadorniga-Valino C, Grummer RR, Armentano LE, Donkin SS, Bertics SJ (1997) Effects of fatty acids and hormones on fatty acid metabolism and gluconeogenesis in bovine hepatocytes. *J. Dairy Sci.* 80:646–656.
56. Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE (2003) Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J Biol Chem* 278: 25323–25330.
57. Calamari L, Ferrari A, Minuti A, Trevisi E (2016) Assessment of the main plasma parameters included in a metabolic profile of dairy cow based on Fourier Transform mid-infrared spectroscopy: preliminary results. *BMC Veterinary Research*, 12, 4.
58. Capurso C, Capurso A (2012) From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids. *ascu Pharmacol.*;57(2-4):91-7.
59. Carpentier JL, Paccaud JP (1994), Molecular and Cellular Biology of Insulin-receptor Internalization. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 733: 266–278.
60. Catalano PM, Nizielski SE, Shao J, Preston L, Qiao L, Friedman JE (2002) Downregulated IRS-1 and PPAR gamma in obese women with gestational diabetes: relationship to FFA during pregnancy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 282:E522–E533.
61. Cavestany D, Blanc JE, Kulcsar M, Uriarte G, Chilibroste P, Meikle A, Febel H, Ferraris A, Krall E (2005) Studies of the transition cow under a pasture-based milk production system: metabolic profiles. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.*;52(1):1-7.
62. Cefalu WT, Hu FB (2004) Role of Chromium in Human Health and in Diabetes. *Diabetes Care*, 27, 2741-2751.

63. Chang PY, Goodyear LJ, Benecke H, Markuns JS, Moller DE (1995). Impaired insulin signaling in skeletal muscles from transgenic mice expressing kinase-deficient insulin receptors. *J. Biol. Chem.* 270, 12593 – 600.
64. Chang X, Mowat DN (1992). Supplemental chromium for stressed and growing feeder calves. *J. Anim. Sci.*, 70: 559- 565.
65. Chang GX, Mallard BA, Mowat DN, Gallo GF (1996) Effect of supplemental chromium on antibody responses of newly arrived feeder calves to vaccines and ovalbumin, *Can J Vet Res*, 60(2), p.140.
66. Chen WY, Chen CJ, Liu CH, Mao FC (2009) Chromium supplementation enhances insulin signalling in skeletal muscle of obese KK/HIJ diabetic mice. *Diabetes Obesity and Metabolism* 11, 293– 303.
67. Chen G, Liu P, Pattar GR (2006) Chromium activates glucose transporter 4 trafficking and enhances insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes via a cholesterol-dependent mechanism. *Mol Endocrinol.*;20(4):857-870.
68. Chew BP, Erb RE, Fessler JF, Callahan CJ and Malven PV (1979) Effects of ovariectomy during pregnancy and of prematurely induced parturition on progesterone, estrogen, and calving traits. *Journal of Dairy Science* 62: 557-566.
69. Chilliard Y, Ferlay A, Doreau M (2001) Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated FA *Livest Prod Sci*, 70, 31-48.
70. Clodfelder BJ, Vincent JB (2005) The time-dependent transport of chromium in adult rats from the bloodstream to the urine. *J Biol Inorg Chem.* 10(4): 383–393.
71. Cohen (2006) The twentieth century struggle to decipher insulin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.*;7(11):867-73.
72. Cohen E, Bieschke J, Perciavalle RM, Kelly JW, Dillin A (2006) Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science.*;313(5793):1604-10.
73. Connolly CC, Papa T, Smith MS, Lacy DB, Williams PE, Moore MC (2007) Hepatic and muscle insulin action during late pregnancy in the dog. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R447–R452.

74. Cornelius CE (1980) Liver function. In: Kaneko JK, ed. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 3rd ed. New York: Academic Press Inc.; 201-258.
75. Cuatrecasas P (1972). Isolation of the Insulin Receptor of Liver and Fat-Cell Membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(2), 318–322.
76. Cunningham JC, Klein BG (2007) Endocrinology. Pages 439–448 in *Textbook of Veterinary Physiology*, fourth ed. Saunders Elsevier, St. Louis, MO, USA.
77. Currie WB, Kelly PA, Friesen HG, Thorburn GD (1977) Caprine placental lactogen: levels of prolactin-like and growth hormone-like activities in the circulation of pregnant goats determined by radioreceptor assays. *J Endocrinol.*;73(2):215-26.
78. Davis CM, Sumrall KH and Vincent JB (1996) The biologically active form of chromium may activate a membrane phosphotyrosine phosphatase (PTP). *Biochemistry*, 35: 12963-9
79. Davis CM, Vincent JB (1997) Chromium oligopeptide activates insulin receptor kinase activity. *Biochemistry* 36:4382–85, 1997.
80. Davies S, McLaren-Howard J, Hunnisset A, and Howard, M. (1997) Age-related decreases in chromium levels in 51,665 hair, sweat, and serum samples from 40,872 patients: implications for the prevention of cardiovascular disease and type II diabetes mellitus. *Metabolism* 46:469-473.
81. De Meyts P (2016) The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network. [Updated 2016 Apr 27]. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network.
82. Denton RM, Tavaré JM (1997) Molecular basis of insulin action on intracellular metabolism. In: Alberti KGMM, Zimmet P, Defronzo RA, Keen H (Hon). *International Textbook of Diabetes Mellitus* (2nd ed) John Wiley & Sons, New York, 469–88.
83. Depew CL, Bunting LD, Fernandez JM, Thompson DL, Adkinson RW (1998) Performance and Metabolic Responses of Young Dairy Calves Fed Diets Supplemented with Chromium Tripicolinate¹. *J Dairy Sci*, 1;81(11): 2916-23.

84. Dinneen S, Alzaid A, Miles J, Rizza, R (1993) Metabolic Effects of the Nocturnal Rise in Cortisol on Carbohydrate Metabolism in Normal Humans *J. Clin. Invest.* 1993. 91:2283-2290.
85. Drackley JK (1999) ADSA foundation scholar award: biology of dairy cows during the transition period: the final frontier?" *J Dairy Sci*, vol. 82, no. 11,2259–2273.
86. Drackley JK, Overton TR, Douglas NG (2001) Adaptations of glucose and long chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *J DairySci* 84,100-12.
87. Draznin (2006) Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: Serine Phosphorylation of IRS-1 and Increased Expression of p85 The Two Sides of a Coin, *Diabetes.* 55(8):2392-7.
88. Douglas ML, Maret LC, Macmillan KL, Morton JM, Hannah MC, Fisher AD, Auldist, MJ (2016) Association of high and low milk protein concentrations with energy allocation, milk production and concentrations of blood plasma metabolites and hormones in Holstein-Friesian cows. *J Dairy Sci* 99, 10057–66.
89. Duckworth WC (1988) Insulin degradation: mechanisms, products, and significance. *Endocr Rev* 9, 319-45.
90. Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG (1998) Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev* 19:608–24.
91. Ducros V (1992) Chromium metabolism, *Biol Trace Elem Res*, 32, 65–77.
92. Duhlmeier R, Hacker A, Widdel A, Von Engelhardt W, Sallmann HP (2005) Mechanisms of insulin-dependent glucose transport into porcine and bovine skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 289, 187-97.
93. EC (European Commission) (2003) Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Trivalent Chromium.
94. Edmundson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster G (1989) A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cow, *J Dairy Sci* 72:68-78.
95. EFSA J (2009) European Food Safety Authority Scientific opinion of the Panel on Additives and Products Used in Animal Feed (FEEDAP) on a request from the European

Commission on the safety and efficacy of chromium methionine (Avail ®Cr) as feed additive for all species; 1043:1–69.

96. Elitok B, Kabu M, Elitok OM (2006) Evaluation of liver function tests in cows during periparturient period. *F U Saglik Bil Dergisi*, 20: 205-09.

97. Emery RS, Liesman JS, Herdt TH (1992) Metabolism of long chain fatty acids by ruminant liver. *J Nutr* 122: 832–37.

98. European Food Safety Authority Scientific opinion on dietary reference values for chromium. *EFSA J* 2014;12:3845.

99. Etherton TD, Bauman DE (1998) Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals *Physiol Rev.* 1998 Jul;78(3):745-61.

100. Evans GW, Bowman TD (1992) Chromium picolinate increases membrane fluidity and rate of insulin internalization. *J Inorg Biochem* 48, 243–250.

101. Faulkner A (1983) Fetal and neonatal metabolism, In: J.A.F. Rook and P.C. Thomas (eds), *Nutritional Physiology of Farm Animals*, (Longman, London), 203-42.

102. Feng W, Li B, Liu J, Chai Z, Zhang P, Gao Y (2003) Study of chromium containing proteins in subcellular fractions of rat liver by enriched stable isotopic tracer technique and gel filtration chromatography. *Anal Bioanal Chem*; 375(3): 363–368.

103. Feng W (2007) The transport of chromium (III) in the body: Implications for function. In: Vincent JB, editor. *The nutritional biochemistry of chromium (III)*. Amsterdam, Elsevier 121–137.

104. Ferguson JD, Galligan DT, Thomsen N (1994) Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *J Dairy Sci* 77, 2695–2703.

105. Forbes JM (1986) The effects of sex hormones, pregnancy, and lactation on digestion, metabolism, and voluntary food intake. Pages 420-435 in *Control of Digestion and Metabolism in Ruminants*. L. P. Milligan, W. L. Grovum, and A. Dobson, ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.

106. Forbes BE, Turner D, Hodge SJ, McNeil KA, Forsberg G, Wallace JC (1998) Localization of an insulin-like growth factor (IGF) binding site of bovine IGF binding

protein-2 using disulfide mapping and deletion mutation analysis of the C-terminal domain *J. Biol. Chem.*, 273, pp. 4647-4652.

107. Friedman JE, Ishizuka T, Shao J, Huston L, Highman T, Catalano P (1999) Impaired glucose transport and insulin receptor tyrosine phosphorylation in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes. *Diabetes*; 48:1807–1814.

108. Friggens NC (2003) Body lipid reserves and the reproductive cycle: towards a better understanding. *Livest. Prod. Sci*;83 :219–236.

109. Fujita S, Rasmussen BB, Cadenas JG, Grady JJ, Volpi E (2006) Effect of insulin on human skeletal muscle protein synthesis is modulated by insulin-induced changes in muscle blood flow and amino acid availability. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E745–E754.

110. Furnival EP, Corbert JL, Inskip MW (1990a) Evaluation of controlled release devices for administration of chromium sesquioxide using fistulated grazing sheep. I. Variation in marker concentration in faeces. *Aust J Agric Res.* 41, 969–75.

111. Garnsworthy PC, Sinclair KD, Webb R (2008) Integration of physiological mechanisms that influence fertility in dairy cows *Animal* (2008), 2:8, pp 1144–1152.

112. George LA, Staniar WB, Cubitt TA, Treiber KH, Harris PA, Geor RJ. Evaluation of the effects of pregnancy on insulin sensitivity, insulin secretion, and glucose dynamics in Thoroughbred mares. *Am J Vet Res.* 2011; 72:666–674.

113. Gerich (1998) The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr Rev.* ;19(4):491-503.

114. Giesy SL, Yoon B, Currie WB, Kim JW, Boisclair YR (2012) Adiponectin deficit during the precarious glucose economy of early lactation in dairy cows. *Endocr.* 153: 834–44.

115. Goldstein BJ, Zhu L, Hager R, Zilbering A, Sun Y, Vincent JB (2001) Enhancement of post-receptor insulin signalling by trivalent chromium in hepatoma cells is associated with differential inhibition of specific protein-tyrosine phosphatases. *J. Trace Elem. Med Biol.* 14, 393–404.

116. Gross J, Van Dorland HA, Bruckmaier RM, Schwarz FJ (2011) Performance and metabolic profile of dairy cows during a lactational and deliberately induced negative energy balance with subsequent realimentation. *J Dairy Sci.* 94:1820-30.

117. Gross JJ, Schwarz FJ, Eder K, van Dorland HA, Bruckmaier RM (2013) Liver Fat Content and Lipid Metabolism in Dairy Cows during Early Lactation and during a Mid-Lactation Feed Restriction. *J Dairy Sci* 96(8). Elsevier: 5008–17.
118. Grummer RR (1993) Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci.* 76(12):3882-96.
119. Grummer RR (1995) Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of Animal Science*, 73, 2820–2833.
120. Grummer RR, Mashek DG, Hayirli A(2004) Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 20:447–70.
121. Guo Q, Manolopoulou M, Bian Y, Schilling AB, Tang WJ (2010). Molecular basis for the recognition and cleavages of IGF-II, TGF- α , and amylin by human insulin degrading enzyme. *J Mol Biol*, 395(2), 430.
122. Gutierrez CG, Gong JG, Bramley TA and Webb R (2006) Selection on predicted breeding value for milk production delays ovulation independently of changes in follicular development, milk production and body weight. *Anim Reprod Sci.* 95, 193–205.
123. Haldar S, Mondal S, Samanta S, Ghosh TK (2009) Effects of dietary chromium supplementation on glucose tolerance and primary antibody response against peste des petits ruminants in dwarf Bengal goats (*Capra hircus*). *Animal.* 3, 209-217.
124. Haldar S, Ghosh TK, Pakhira MC, De K (2006) Effects of incremental dietary chromium (Cr³⁺) on growth, hormone concentrations and glucose clearance in growing goats (*Capra hircus*), *J Agr Sci*, 144: Hruz PW, Mueckler MM (2001) Structural analysis of the GLUT1 facilitative glucose transporter (review). *Mol. Membr. Biol.* 18, 183–193.
125. Hanigan MD (2004) A model of net amino acid absorption and utilization by the portal-drained viscera of the lactating dairy cow, *J Dairy Sci*, 87, 4247-68.
126. Hanson RW Ballard FJ (1967) The relative significance of acetate and glucose as precursors for lipid synthesis in liver and adipose tissue from ruminants. *Biochem. J.*, 105,529-536.

127. 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):749-74.
128. Hayirli A, Bremmer DR, Bertics SJ, Socha MT, Grummer RR (2001) Effect of chromium supplementation on production and metabolic parameters in periparturient dairy cows, *J Dairy Sci*, 84, 1218–30.
129. Haymond MW, Sunehag A (1999) Controlling the sugar bowl. Regulation of glucose homeostasis in children. *Endocrinol Metab Clin North Am* 28,663-94.
130. Heitmann RN, Dawes DJ, Sensenig SC (1987) Hepatic ketogenesis and peripheral ketone body utilization in the ruminant. *J. Nutr.* 117:1174–1180.
131. Herbein JH, Aiello RJ, Eckler LI, Pearson RE, Akers RM (1985) Glucagon, insulin, growth hormone and glucose concentrations in blood plasma of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 8: 320–325.
132. Herdt TH (2000) Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice*, 16, 215–230.
133. Herzog, K. 2001. Versuche zur pankreatischen Insulin-Response von trockenstehenden und laktierenden Kühen sowie Kühen mit Leberverfettung mittels intravenösem Glucose-toleranztest und hyperglykämischer Clamp-Technik. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Veterinärmedizin (Dr. Med. Vet.) durch die Tierärztliche Hochschule Hannover.
134. Hiromasa O (2016) *The Liver in Systemic Diseases* Springer, ISBN 4431557903, 9784431557906.
135. Hirsch E, Costa C, Ciralo E (2007) Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling, *Journal of Endocrinology* 194, 243–256.
136. Hocquette JF, Graulet B, Castigliadelavaud C, Bornes F, Lepetit N, Ferre P (1996) Insulin-sensitive glucose transporter transcript levels in calf muscles assessed with a bovine GLUT4 cDNA fragment. *Int J Biochem Cell Biol* 28, 795-806.

137. Holtenius P, Holtenius K (2007) A model to estimate insulin sensitivity in dairy cows. *Acta Vet. Scand.* 49: 29–31.
138. Horino M, Machlin LJ, Hertelendy F, Kipnis DM (1968) Effect of short-chain fatty acids on plasma insulin in ruminant and nonruminant species. *Endocrinology*, 83, 118-128.
139. Horvath EM, Tackett L, McCarthy AM, Raman P, Brozinick JT, Elmendorf JS (2008) Antidiabetogenic effects of chromium mitigate hyperinsulinemia-induced cellular insulin resistance via correction of plasma membrane cholesterol imbalance. *Molecular Endocrinology* 22, 937–50.
140. Hotamisligil, GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM (1996) IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 271:665–668.
141. Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE, Spiegelman BM (1996) Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science*.;274(5291):1377-9.
142. Hua Y, Clark S, Ren J, Sreejayan N (2012) Molecular mechanisms of chromium in alleviating insulin resistance, *J Nutri Bioch*, 23: 313–319.
143. Huang S, Czech MP(2007)The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metabolism*,5,237-52.
144. Hulse RE, Ralat LA, Wei-Jen T (2009). Structure, function, and regulation of insulin-degrading enzyme. *Vitam. Horm.* 80, 635–648.
145. Hunter SJ, Garvey WT (1998) Insulin action and insulin resistance: Diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system. *Am J Med* 105:331–345.
146. Ingle DL, Bauman DE, Garigus US (1972) Lipogenesis in ruminant: in vitro study of tissue sites, carbon source and reducing equivalent generation of fatty acid synthesis. *J. Nutr* 102(5):609-16.
147. Ingledew WM (1999) Yeast-could you base a business on this bug? Pages 27-47 in *Biotechnology in the Feed Industry*. Proc. of Alltech's 15th Annual Symposium. T. P. Lyons and K. A. Jacques, eds. Nottingham University Press, Nottingham, UK.

148. Ingvarstsen KL, Dewhurst RJ, Friggens NC (2003) On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper. *Livest. Prod. Sci.* 2003, 83: 277 – 08.
149. Ingvarstsen KL (2006) Feeding- and management-related diseases in the transition cow. Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126: 175–13.
150. Institute of Medicine (US) Panel on Micronutrients Dietary reference intakes for vitamin A, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington (DC): National Academies Press
151. Irvine AJ, Butterwick R, Watson T, Millward DJ, Morgan LM (2002) Determination of insulin sensitivity in the dog: an assessment of three methods. *J Nutr.* 132:1706S–1708S.
152. Jeebhoy KN, Chu RC, Marliss EB, Greenberg GR, Bruce RA (1977) Chromium deficiency, glucose intolerance and neuropathy reversed by chromium supplementation in a patient receiving longterm total parenteral nutrition, *Am J Clin Nutr*, 30, 531–38.
153. Joost HG, Thorens B (2001) The Extended GLUT-Family of Sugar/Polyol Transport Facilitators: Nomenclature, Sequence Characteristics, and Potential Function of Its Novel Members. *Mol Membr Biol* 18: 247-256.
154. Kafilzadeh F, Shanankareh HK, Targhibi MR (2012) Effect of chromium supplementation on productive and reproductive performances and some metabolic parameters in late gestation and early lactation of dairy cows. *Biol. Trace. Elem. Res.* 149, 42-9.
155. Kahn CR (1978) Insulin resistance, insulin sensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. *Metabolism* 27: 1893–902.
156. Kahn CR (1985) Current concepts of the molecular mechanism of insulin action. *Ann Rev Med* 36:429–51.
157. Kahn SE, Prigeon RL, McCulloch DK, Boyko EJ, Bergman RN, Schwartz MW, Neifing JL, Ward WK, Beard JC, Palmer JP (1994) The contribution of insulin-dependent and insulin-independent glucose uptake to intravenous glucose tolerance in healthy human subjects *Diabetes*. 1994 Apr;43(4):587-92.

158. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes *Nature* .444(7121):840-6.
159. Kamath SM, Stoecker BJ, Davis-Whitenack ML, Smith MM, Adeleye BO, Sangiah S. (1997) Absorption, retention and urinary excretion of chromium-51 in rats pretreated with indomethacin and dosed with dimethylprostaglandin E2, misoprostol or prostacyclin. *J Nutr* 127:478–482.
160. Kandror KV, Pilch PF (1996) Compartmentalization of protein traffic in insulin-sensitive cells. *Am J Physiol*; 271: E1-14.
161. Kandror KV (1999) Insulin regulation of protein traffic in rat adipocyte cells, *J Biol Chem*, 274, 25210–17.
162. Karpe F, Dickmann JR, Frayn KN (2011) Fatty Acids, Obesity, and Insulin Resistance: Time for a Reevaluation. *Diabetes*. 2011;60(10):2441-2449.
163. Katome T, Obata T, Matsushima R, Masuyama N, Cantley LC, Gotoh Y, Kishi K. Shiota H, Ebina Y (2003) Use of RNA interference-mediated gene silencing and adenoviral overexpression to elucidate the roles of AKT/protein kinase B isoforms in insulin actions. *J. Biol. Chem.* 278, 28312-28323.
164. Kegley EB, Spears JW, Brown TT (1996) Immune Response and Disease Resistance of Calves Fed Chromium Nicotinic Acid Complex or Chromium Chloride¹, *J Dairy Sci*, 79(7), 1278-83.
165. Kegley EB, Spears JW, Brown TT (1997) Effect of shipping and chromium supplementation on performance, immune response, and disease resistance of steers, *J Anim Sci*, 75(7), 1956-64.
166. Kessel S, Stroehl M, Meyer HH, Hiss S, Sauerwein H, Schwarz FJ, Bruckmaier RM. (2008) Individual variability in physiological adaptation to metabolic stress during early lactation in dairy cows kept under equal conditions. *J Anim Sci.*;86(11):2903-12.
167. Khalili M, Foroozandeh AD, Toghyani M (2012) Lactation performance and serum biochemistry of dairy cows fed supplemental chromium in the transition period. *AJB* 10(50), 10304-10.

168. Kido Y, Nakae J, Accili D (2001) The insulin receptor and its cellular targets. *J Clin Endocrinol Metab.*86:972.
169. Kirovski D, Sladojevic Z. (2017) Prediction and open Diagnosis of Fatty Liver in Dairy Cows. *J Gastroenterol.*3(1): 1005.
170. Kitchalong L, Fernandez JM, Bunting LD, Southern LL, Bidner TD (1995) Influence of chromium tripicolinate on glucose metabolism and nutrient partitioning in growing lambs. *J. Anim. Sci.*, 73: 2694–2704.
171. Kokkonen T, Salin S, Taponen J, Vanhatalo A, Elo K. (2009) Effects of abomasal infusion of tallow and camelina oil on responses to glucose and insulin in dairy cows during late pregnancy. In:ChilliardY et al. (Eds) *Proceedings of the XIth Internation Symposium on Ruminant Physiology.Ruminant physiology: digestion, metabolism, and effects of nutrition on reproduction and welfare.*Clermont-Ferrand.Wageningen Academic Publishers. 440–1.
172. Komatsu T, Itoh F, Kushibiki S, Hodate K (2005) Changes in gene expression of glucose transporters in lactating and nonlactating cows. *J Anim Sci*, 83, 557–564.
173. Kräft S (2004) Charakterisierung der peripheren insulin-response und insulin-sensitivität bei trockenstehenden, laktierenden und leberverfetteten milchkühen ohne und mit ketose mittels hyperinsulinämischer, euglycämischer clamps. *Academic Dissertation Tierärztliche Hochschule, Hannover.*
174. Kuhla B, Nurnberg G, Albercht D, Gors S, Hammon HM Matges CC (2011) Involvement of skeletal muscle protein, glycogen, and fat metabolism in the adaptation on early lactation of dairy cows. *J Proteome Res* 10, 4252–4262.
175. Kumar V, Abbas AK, Fausto N (2006) *Le basi patogenetiche delle malattie.* Elsevier. 1189– 205.
176. Lacombe, Véronique A (2014) Expression and Regulation of Facilitative Glucose Transporters in Equine Insulin-Sensitive Tissue: From Physiology to Pathology, *ISRN Veterinary Science*, vol.2014Article ID 409547, 15 pages.
177. Ladyman SR, Augustine RA, Grattan DR (2010) Hormone interactions regulating energy balance during pregnancy. *J. Neuroendocrinol.* 22:805–817.

178. Langard S, Norseth T (1979) Chromium. Pages 383-397 in L. Friberg, G. F. Nordberg, and V. B. Vouk (eds.). Handbook on the toxicology of metals. Elsevier/North Holland Biomedical Press.
179. Lanzerstorfer P, Yoneyama Y, Hakuno F, Muller U, Hoglinger O, Takahashi SI, Weghube J (2015) Analysis of insulin receptor substrate signaling dynamics on microstructured surfaces FEBS Journal 282, 987–1005.
180. Larsen M, Kristensen NB (2009) Effect of abomasal glucose infusion on splanchnic amino acid metabolism in periparturient dairy cows. J. Dairy Sci. 92, 3306–18.
181. Leclercq IA, Alain SM, Schroyen B, Hul1 NV, Geerts A (2007) Review Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: Mechanisms and consequences J Hepatol 47, 142–56.
182. Lee JO, Lee SK, Kim JH, Kim N, You GY, Moon JW, Kim HS (2012) Metformin Regulates Glucose Transporter 4 (GLUT4) Translocation through AMP-activated Protein Kinase (AMPK)-mediated Cbl/CAP Signaling in 3T3-L1 Preadipocyte Cells. J Biol Chem, 287(53), 44121–9.
183. Lee J, Miyazaki M, Romeo GR, Shoelson SE (2014) Insulin Receptor Activation with Transmembrane Domain Ligands. The Journal of Biological Chemistry.;289(28):19769-19777.
184. Leissring MA, Farris W, Wu X, Christodoulou DC, Haigis MC, Guarente L, Selkoe DJ. (2004) Alternative translation initiation generates a novel isoform of insulin-degrading enzyme targeted to mitochondria. Biochem J.;383:439–446.
185. Leiva T, Cooke RF, Brandão AP , Aboin AC, Ranches J, Vasconcelo JLM (2015) Effects of excessive energy intake and supplementation with chromium propionate on insulin resistance parameters, milk production, and reproductive outcomes of lactating dairy cows Livest Sci 180;121–8.
186. Lemosquet, S., Debras, E., Balage, M., Hocquette, J.F., Rulquin, H., Grizard, J. (2002). Shortterm mild hyperglycemia enhances insulin-stimulated glucose disposal in lactating goats. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 282, 464-474.

187. Lim TH, Sargent T. Kusubov (1983) Kinetics of trace element chromium (III) in the human body” *Am. J. Physiol.* 244 (Regulatory integrative Comp. Physiol., 13), R445-R454.
- Liu J, Kimura A, Baumann CA, Saltiel AR (2002) APS facilitates c-Cbl tyrosine phosphorylation and GLUT4 translocation in response to insulin in 3T3-L1 adipocytes *Mol Cell Biol.* ;22(11):3599-609.
188. Liu X, Xue Y, Li C, Lou Q, Wang J, Yanagita T, Xueand C, Wang Y (2013) Eicosapentaenoic acid-enriched phospholipid ameliorates insulin resistance and lipid metabolism in diet-induced-obese mice *Lipids in Health and Disease* 2013, 12:109.
189. Lindemann MD, Wood CM, Harper AF, Kornegay ET, Anderson RA (1995) Dietary chromium picolinate additions improve gain/feed and carcass characteristics in growing-finishing pigs and increase litter size in reproducing sows, *J Anim Sci*, 73(2):457–65.
190. Lloyd KE, Fellner V, McLeod SJ, Fry RS, Krafka K, Lamptey A, Spears JW (2010) Effects of supplementing dairy cows with chromium propionate on milk and tissue chromium concentrations. *J Dairy Sci.*;93(10):4774-80.
191. Locher LF, Meyer N, Weber EM, Rehage J, Meyer U, Danicke S (2011)Hormone-sensitive lipase protein expression and extend of phosphorylation in subcutaneous and retroperitoneal adipose tissues in the periparturient dairy cows. *J D Sci* 94, 4514–4523.
192. Lucy MC, Evans TJ, Poock SE (2016) Lymphocytic foci in the endometrium of pregnant dairy cows: Characterization and association with reduced placental weight and embryonic loss *Theriogenology*;86(7):1711-9.
193. Mackowiak P, Krejpcio Z, Sassek M, Kaczmarek P, Hertig I, Chmielewska J, Wojciechowicz T, Szczepankiewicz D, Wiczorek D, Szymusiak H, Nowak WK (2010) Evaluation of insulin binding and signaling activity of newly synthesized chromium(III) complexes in vitro. *Mol Med*,3, 347-53.
194. Mallard BA, Wagter LC, Ireland MJ, Dekkers CM (1997) Effects of growth hormone, insulin-like growth factor-I, and cortisol on periparturient antibody response profiles of dairy cattle *Vet Immunol Immunopathol.* 60, 61-76.
195. McGuire MA, Griinari JM, Dwyer DA, and Bauman DE (1995) Role of insulin in the regulation of mammary synthesis of fat and protein. *J Dairy Sci* 78: 816–824.

196. McNamara JP (1995) Role and regulation of adipose tissue metabolism during lactation, *J Nutr Biochem*, 6, 120-29.
197. McNamara JP, Valdez F (2005) Adipose tissue metabolism and production responses to calcium propionate and chromium propionate, *J Dairy Sci*, 88, 498–507.
198. Mertz W (1992) Chromium: history and nutritional importance. *Biol Trace Elem Res* 32, 3–8.
199. Mertz W (1969) Chromium occurrence and function in biological systems. *Physiol Rev* 49:163–, 239.
200. Mertz WE, Toepfer W, Roginski EE, Polansky MM (1974) Present knowledge of the role of Cr. *Fed. Proc.* 33:2275.
201. Mirsky IA, Broh-Kahn RH (1949) The inactivation of insulin by tissue extracts. the distribution and properties of insulin inactivating extracts. *Arch Biochem*; 20:1–9.
202. Moonsie-Shageer S, Mowat DN (1993) Effect of level of supplemental chromium on performance, serum constituents and immune status of stress feeder calves, *J Anim Sci*, 71:232–8.
203. Mozaffari-Khosravi H, Jalali-Khanabadi BA, Afkhami-Ardekani M, Fatehi F (2009) Effects of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on lipid profile and lipoproteins in patients with type II diabetes. *J Altern Complement Med.* 15:899–903.
204. Mowat DN (1994) Organic chromium: a new nutrient for stressed animals. In: *Proceedings of Alltech's 10th Annual Symposium, Biotechnology in the Feed Industry*, Lyons P., Jacques K. A. (eds.), Nottingham University Press, UK, 275–282.
205. Mowat DN, Chang X and Yang WZ (1993) Chelated chromium for stressed feeder calves. *Can J Anim Sci* 73, 49-55.
206. Mueckler M, Thorens B (2013) The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med* 34: 121-138.
207. Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ (2007) Cardiovascular actions of insulin. *Endocr. Rev.* 28, 463-491.

208. Musial B, Fernandez-Twinn DS, Vaughan OR, Ozanne SE, Voshol P, Sferruzzi-Perri, AN, Fowden AL (2016) Proximity to delivery alters insulin sensitivity and glucose metabolism in pregnant mice. *Diabetes*, 65(4), 851–860.
209. Myers MG, Jr, Zhang Y, Aldaz GA, Grammer T, Glasheen EM, Yenush L, Wang LM, Sun XJ, Blenis J, Pierce JH, White MF. (1996) YMXM motifs and signaling by an insulin receptor substrate 1 molecule without tyrosine phosphorylation sites. *Mol Cell Biol.*;16:4147–4155.
210. Nafikov RA, Beitz DC (2007) Carbohydrate and lipid metabolism in farm animals, *J Nutr.*;137(3):702-5.
211. Nakae J, Kitamura T, Silver DL, Accili D (2001) The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression, *J. Clin. Invest.*, 108,1359-67.
212. National Research Council (2001). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. National Academy Press, Washington, DC.
213. Nguyen MTA, Satoh H, Favelyukis S, Babendure J, Imamura T, Sbodio JI, Zalevsky J, Dahiyat BI, Chi NW, Olefsky JM (2005) JNK and Tumor Necrosis Factor- α Mediate Free Fatty Acid-induced Insulin.
214. Nikkiah A, Mirzaei M, Khorvash M., Rahmani HR, Ghorbani GR (2011) Chromium improves production and alters metabolism of early lactation cows in summer. *J Anim Physiol Anim Nutr* 95, 81–89.
215. Nishimoto H, Matsutani R, Yamamoto S, Takahashi T, Hayashi KG, Miyamoto A, Hamano S, Tetsuka M (2006) Gene expression of glucose transporter (GLUT) 1, 3 and 4 in bovine follicle and corpus luteum. *J. Endocrinol.* 188: 111–119.
216. Noel S, Herman A, Johnson GA, Gray CA, Stewart MD, Bazer FW, Gertler A, Spencer T (2003). Ovine placental lactogen specifically binds to endometrial glands of the ovine uterus *Biol Reprod.* 2003 Mar;68(3):772-80.
217. NRC. 2005. *Mineral Tolerance of Animals*. 2nd rev. ed., National Academy Press, Washington, DC.

218. O'Brien RM, Granner DK (1990) PEPCK gene as a model of inhibitory effects of insulin on gene transcription. *Diabetes Care*, 13, 327–334.
219. Offenbacher EG, Spencer H, Dowling HJ (1986) Metabolic chromium balances in men. *Am J Clin Nutr* 1986;44:77–82.
220. Oetzel GR, SM McGuirk (2008) Evaluation of a hand-held meter for cow-side evaluation of blood beta-hydroxybutyrate and glucose concentrations in dairy cows. *Proc. Am. Assoc. Bov. Pract.* 41: 234.
221. Offenbacher EG, Pi-Sunyer FX (1980) Beneficial effect of chromium-rich yeast on glucose tolerance and blood lipids in elderly subjects. *Diabetes*;29:919-25.
222. Ohh SJ, Lee JY (2005) Dietary chromium-methionine chelate supplementation and animal performance. *Asian-Aust. J Anim Sci.* 18(6): 898–7.
223. Oikawa S, Oetzel GR (2006) Decreased insulin response in dairy cows following a four-day fast to induce hepatic lipidosis. *J D Sci* 89, 2999– 3005.
224. Okaka T, Sakuma L, Fukui Y, Hageli O, Ui M (1994) Blockage of chemotactic peptide-induced stimulation of neutrophils by wort-manin as a result of selective inhibition of phosphatidylinositol kinase. *J Biol Chem*; 269:3563-67.
225. Okere C, Hacker RR (1995) Reproduction and endocrine responses of gestating gilts to selected micro-nutrient supplementation. *J. Anim. Sci.* 73(Suppl.1):251.
226. Oliveira L.H., A.B. Nascimento, P.L.J. Monteiro Jr., M.M. Guardieiro, M.C. Wiltbank, R. Sartor 2016 Development of insulin resistance in dairy cows by 150 days of lactation does not alter oocyte quality in smaller follicles *Volume 99, Issue 11, Pages 9174–83.*
227. Oltenacu PA, Broom DM (2001) The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. *Anim Welf.* 2010;19:39–49.
228. Onita P, Colibar O (2009). Energy, Protein and Mineral profile in periparturient dairy cows. *Lucrari Stintifice Medicina Vet.* Vol.2: 398-404.
229. Ostrowska M, Jarczак Justyna J, Zwierzchowski L (2015) Glucose transporters in cattle - a review, *Anim. Sci. Pap. Rep* 3(3):191-212.
230. Overton TR (2001) Transition cow programs. The good, the bad, and how to keep them from getting ugly. *Adv Dairy Tech* 13: 17.37,53,68.

231. Pacini G, Omar B, Ahrén B (2013) Methods and models for metabolic assessment in mice. *J. Diabetes. Res.* 2013:986906.
232. Page TG, Southern LL, Ward TL (1993) Effect of chromium picolinate on growth and serum and carcass traits of growing-finishing pigs, *J Anim Sci*, 71:656–62.
233. Papassiopi N, Kontoyianni A, Vaxevanidou K, Xenidis A (2009). Assessment of chromium biostabilization in contaminated soils using standard leaching and sequential extraction techniques. *Sci. Total Environ.* 407:925-936.
234. Pattar GR., Tackett L, Liu P, Elmendorf JS (2006) Chromium picolinate positively influences the glucose transporter system via affecting cholesterol homeostasis in adipocytes cultured under hyperglycemic diabetic conditions. *Mutat. Res.* 610:93-100.
235. Pechova A, Podhorsky A, Lokajova E, Pavlata L, Illek J (2002) Metabolic effects of chromium supplementation in dairy cows in the periparturient period, *Acta Vet Brno*, 71, 9–18
Pechova A, Pavlata L (2007) Chromium as an essential nutrient: a review *Vet Med-Czech*, 52: 1–18.
236. Pederson TM, Kramer DL, Rondinone (2001) Serine/Treonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degeneration: possible regulation of tyrosine phosphorylation. *Diabetes* 50, 24-31.
237. Pere MC, Etienne M and Dourmad JY (2000) Adaptations of glucose metabolism in multiparous sows: effects of pregnancy and feeding level. *J Anim Sci* 78, 2933–1.
238. Petterson SW (200) Effect of chromium on milk production and plasma insulin concentration in dairy cows, *Proc N.Z. Soc Anim Prod*, 60:307- 17.
239. Pires JAA, Souza AH, Grummer RR (2007) Induction of hyperlipidemia by intravenous infusion of tallow emulsion causes insulin resistance in Holstein cows. *J Dairy Sci.* (90)2735–2744
240. Potter JF, Levin P, Anderson RA, Freiberg JM, Andres R (1985): Glucose metabolism in glucose-intolerant older people during chromium supplementation. *Metabolism*, 34, 199–194.
241. Prior RL, Scott RA (1980) Effects of intravenous infusions of glucose, lactate, propionate or acetate on the induction of lipogenesis in bovine adipose tissue. *J. Nutrition*, 110: 2011–9

242. Prodi E, Obici S (2006) Minireview: the brain as a molecular target for diabetic therapy. *Endocrinology*;147(6):2664-9.
243. Pryce JE Veerkamp RF (2001) The Incorporation of Fertility Indices in Genetic Improvement Programmes. In: Diskin, M.G., Ed., *Fertility in the High-Producing Dairy Cow*, Vol. 1, British Society of Animal Science, Scotland, 237-250.
244. Qi C, Pekala PH (2000) Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in adipocytes. *Proc Soc Exp Biol Med.*;223(2):128-35.
245. Rajan MR, Fagerholm S, Jonsson C, Kjølhede P, Turkina MV (2013) Phosphorylation of IRS1 at Serine 307 in Response to Insulin in Human Adipocytes Is Not Likely to be Catalyzed by p70 Ribosomal S6 Kinase. *PLoS ONE* 8(4): e59725.
246. Ramos-Román MA (2011) Prolactin and lactation as modifiers of diabetes risk in gestational diabetes. *Horm Metab Res* 43:593–600.
247. Renaville R, Hammadi M, Portetelle D. (2002) Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism *Domest Anim Endocrinol* ;23(1-2):351-60.
248. Reverchon M, Ram C, Cogni J, Briant E, Elis S, Guillaume D, Dupont J (2014) Resistin in dairy cows: plasma concentrations during early lactation, expression and potential role in adipose tissue. *PLoS One* 9, e93198.
249. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition (Text with EEA relevance)
250. Reynolds CK, Huntington GB, Tyrrell HF, Reynolds PJ (1988) Net portal-drained visceral and hepatic metabolism of glucose, L-lactate, and nitrogenous compounds in lactating holstein cows. *J Dairy Sci.*;71(7):1803-12.
251. Reynolds CK, Aikman PC, Lupoli B, Humphries DJ, Beever DE (2003) Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. *J Dairy Sci*, 86, 1201-7.
252. Richieri GV, Kleinfeld AM (1995) Unbound free fatty acid levels in human serum. *J Lipid Res.* 1995 Feb;36(2):229-40.

253. Rigout S, Lemosquet S, Van Eys JE, Blum JW, Rulquin H (2002) Duodenal glucose increases glucose fluxes and lactose synthesis in grass silage-fed dairy cows, *J Dairy Sci.*, 85; 595-6.
254. Rockwell RJ, Allen MS (2016) Chromium propionate supplementation during the peripartum period interacts with starch source fed postpartum: Production responses during the immediate postpartum and carryover periods. *J. Dairy Sci.* 99:4453–63.
255. Roginski EF, Mertz W (1969) Effects of chromium (III) supplementation on glucose and amino acid metabolism in rats fed a low protein diet. *Journal of Nutrition*, 97, 525–30.
256. Rui L, Fisher TL, Thomas J, White MF (2001) Regulation of insulin/insulin-like growth factor-1 signaling by proteasome-mediated degradation of insulin receptor substrate-2, *J Biol Chem*, 276:40362–7.
257. Rukkwamsuk T, Wensing T, Geelen MJH (1999) Effect of fatty liver on hepatic gluconeogenesis in periparturient cows. *J. Dairy Sci.* 82:500.
258. Rukkwamsuk T, Kruij TA, Wensing T (1999) Relationship between overfeeding and overconditioning in the dry period and the problems of high producing dairy cows during the postparturient period. *Vet. Q.* 21: 71–7.
259. Sadri H, Ghorbani GR, Rahmani H, Bruckmaier RM (2009) Chromium supplementation and substitution of barley grain with corn: Effects on performance and lactation in periparturient dairy cows *J Dairy Sci* 92(11):5411-8.
260. Sadri H, Rahmani HR, Khorvash M, Ghorbani GR, Bruckmaier RM (2012) Chromium supplementation and substitution of barley grain with corn: Effects on metabolite and hormonal responses in periparturient dairy cows *J Anim Physiol Anim Nutr*, 96(2):220-7.
261. Sahin K, Sahin N, Kucuk O (2002) Effects of dietary chromium picolinate supplementation on serum and tissue mineral contents of laying Japanese quails. *Journal of Trace Element Experiment and Medicine*, 15, 163-169.
262. Sahin N, Akdemir F, Tuzcu M, Hayrli A, Smith MO, Sahin K (2010) Effects of supplemental chromium sources and levels on performance, lipid peroxidation, and proinflammatory markers in heat-stressed quails. *Animal Feed Science Technology* 159: 143-9.

263. Saltiel AR, Kahn CR (2001) Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806.
264. Saltiel AR, Pessin JE (2003) Insulin signaling in microdomains of the plasma membrane. *Traffic* 4, 11–16.
265. Šamanc H, Nikolić-Judith A, Bugarski DD, Kulcsar M, Ivanov I. V Huszenicza G Glycemia, glucocorticoids and adrenocortical reserve in postpartal dairy cows *Acta veterinaria Beograd*, (1999), vol. 49 br. 5-6, str. 281-288
266. Šamanc H., Stojić V, Kirovski, D., Jovanovic, 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* 1, 897602
267. Samuel VT, Shulman GI (2012) Mechanisms for insulin re-sistance: Common threads and missing links. *Cell* 148:852–71.
268. Sano H, Nakai M, Kondo T, Terashima Y (1991) Insulin responsiveness to glucose and tissue responsiveness to insulin in lactating, pregnant, and nonpregnant, nonlactating beef cows. *J Anim Sci* 69, 1122–7.
269. Sano H, Mowat DN, Ball RO, Trout DR (1997) Effect of supplemental chromium on whole-body kinetics of glucose, lactate, and propionate in rams fed a high grain diet. *Comp. Biochem. Physiol.* 118:117-121.
270. Sarah L, Bohyung Y, Bruce C, Jin WK, Yves RB (2012) Adiponectin deficit during the precarious glucose economy of early lactation in dairy cows. *Endocrin.* 153, 5834–44.
271. Sasaki SI (2002) Mechanism of insulin action on glucose metabolism in ruminants. *Anim. Sci. J.*; 73:423–433.
272. Sayato Y, Nakamura K, Matsui S, Ando M (1980) Absorption of trace metals in the zinc-deficient rats. *J. Pharmacodyn.* 3, 17.
273. Schroeder HA, Balassa JJ, Vinton WH, Jr. (1965) Chromium, cadmium and lead in rats. *J. Nutr.* 86:51.
274. Schulze EH, Fuhrmann ES, Neitzel, Giese WW Sallmann HP (1991) Glucose entry rate in dairy cattle as determined by stable isotope ¹³C-labelled glucose at different stages of reproduction. *Comp. Biochem. Physiol. B* 100(1):167-171.

275. Schwarz K, Mertz W (1959) Chromium (HI) and the glucose tolerance factor (Letters to the Editors). *Arch. Biochem. Biophys.* 85: 292-295.
276. Shah OJ, Wang J, Hunter T (2004) Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Curr. Biol.* 14:1650–1656.
277. Shen Y, Joachimiak A, Rich Rosner M, Tang W (2006) Structures of human insulin degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism. *Nature*;443: 870–874.
278. Shulman GI (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106, 171–176
279. Simek M, Zemanova D, Tvrznik P, Krasa A (1999) Vliv organické formy chromu (Biochrom) na produkci a kvalitu mléka dojnic. In: *Proceedings of III. Kábrtovy dietetické dny, VFU Brno*, pp. 32-42.
280. Sinclair KD (2010) Declining fertility, insulin resistance and fatty acid metabolism in dairy cows: developmental consequences for the oocyte and preimplantation embryo. *Acta Sci Vet* 38, 545–557.
281. Skovbjerg LL, Stipp SLS, Utsunomiya S, Ewing RC (2006) *Geochimica et Cosmochimica Acta.*, 70 3582-92.
282. Smith RD (1974) Some physiological responses of dairy cattle fed high silage diets. Ph.D. Thesis. Cornell University, Ithaca, NY.
283. Smith U (2002) Impaired ('diabetic') insulin signaling and action occur in fat cells long before glucose intolerance- is insulin resistance initiated in the adipose tissue? *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002;26:897-904.
284. Smith KL, Waldron MR, Drackley JK, Socha MT, Overton TR (2005) Performance of dairy cows as affected by prepartum dietary carbohydrate source and supplementation with chromium throughout the transition period. *J. Dairy Sci.*, 88: 255-263.
285. Soltan MA (2010) Effect of dietary chromium supplementation on productive and reproductive performance of early lactating dairy cows under heat stress. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 94, 264–72.

286. Soltan MA, Almujaali AM, Mandour MA, Abeer ME (2012) Effect of dietary chromium supplementation on growth performance, rumen fermentation characteristics and some blood serum units of fattening dairy calves under heat stress. *PJN*, 11: 751- 6.
287. Spachmann SK, Schonhosen U, Kuhla B, Rontgen M, Hammon HM (2013) Insulin signaling of glucose uptake in skeletal muscle of lactating dairy cows. In: J. W. Oltjen, E. Kebreab, H. Lapierre (eds), *Energy and Protein Metabolism and Nutrition in Sustainable Animal Production*, Vol. 134. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, p 277–278.
288. Spears JW, Whisnant CS, Huntington GB, Lloyd KE, Krafka K, Lamptey A (2010) Effects of dietary chromium propionate on glucose metabolism and insulin sensitivity in growing cattle, *J Dairy Sci*, 93, 780.
289. Spears JW (1999) Reevaluation of the metabolic essentiality of the minerals – review. *Asian Australian Journal of Animal Science* 12, 1002-8.
290. Spears JW, Whisnant CS, Huntington GB, Lloyd KE, Fry RS, Krafka K, Lamptey A. (2012) Chromium propionate enhances insulin sensitivity in growing cattle. *J. Dairy Sci.* 95:2037-2045.
291. Spears JW, Trivedi S. (2013) Chromium (III) and the immune system. Pages 641-645 in *Encyclopedia of Metalloproteins*.
292. Sreejayan N, Dong F, Kandadi MR, Yang X, Ren J (2008) Chromium alleviates glucose intolerance, insulin resistance, and hepatic ER stress in obese mice, *Obesity (Silver Spring)*, 16: 1331–7.
293. Subiyatno A, Mowat DN, Yang ZW (1996) Metabolic and hormonal responses to glucose and propionic acid infusions in periparturient cows supplemented with chromium. *J D Sci* 79, 1436–45.
294. Sudoh S, Frosch MP, Wolf B (2002) Differential effects of protease involved in intracellular degradation of amyloid-beta protein between detergent soluble and insoluble pools in CHO-695 cells. *Biochemistry*; 41:9.
295. Stahlhut HS, Whisnant CS, Lloyd KE, Baird EJ, Legleiter LR, Hansen SL, Spears JW (2006) Effect of chromium supplementation and copper status on glucose and lipid metabolism in Angus and Simmental beef cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 128, 253–65.

296. Stoecker BJ (1999b) Chromium absorption, safety, and toxicity, *J Trace Elem Exp Med*,12, 163–9.
297. Strang BD, Bertics SJ, Grummer RR, Armentano LE (1998) Effect of long-chain fatty acids on triglyceride accumulation, gluconeogenesis, and ureagenesis in bovine hepatocytes *J Dairy Sci.*;81(3):728-39.
298. Stuart CA, Yin D, Howell MEA, Dykes RJ., Laffan JJ, Ferrando AA (2006) Hexose transporter mRNAs for GLUT4, GLUT5, and GLUT12 predominate in human muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*; 291:E1067-E1073.
299. Subiyatno A, Mowat DN, Yang WZ (1996) Metabolite and hormonal responses to glucose or propionate infusions in periparturient dairy cows supplemented with chromium, *J D Sci*, 79, 1436–45.
300. Sumner JM, McNamara JP (2007) Expression of lipolytic genes in the adipose tissue of pregnant and lactating Holstein dairy cattle. *J Dairy Sci* 90: 5237–5246.
301. Sundrum (2015) Metabolic Disorders in the Transition Period Indicate that the Dairy Cows' Ability to Adapt is Overstressed. *Animals (Basel).*;5(4):978-20.
302. Sykiotis GP, Papavassiliou AG (2001) Serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1a novel target for the reversal of insulin resistance, *Mol Endocrinol*,15:1864-9.
303. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn R (2006) Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7, 85–96.
304. Targhibi MR, Karami Shabankareh H, Kafilzadeh (2012) Effects of Supplemental Chromium on Lactation and Some Blood Parameters of Dairy Cows in Late Gestation and Early Lactation *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 7 (11):1205-1211.
305. Tenant BC (1997): Hepatic function. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. (Kaneko, J. J., W. Harvey, M. L. Bruss, Eds.). 5th ed. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto. pp. 327-349.
306. Terramoccia S, Bartocci S, Lillini E (2005) Milk Yield and Immune Response of Periparturient and Early Lactation Friesian Cows Fed Diets Supplemented with a High Level of Amino-acid Chelated Chromium *Asian Aust. J. Anim. Sci.* 2005. Vol 18(8):1098-4

307. Thorens B (1996) Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 270, 541-553.
308. Thorens B, Mueckler M (2009) Glucose transporters in the 21st Century *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010 Feb; 298(2): E141–E145.
309. Threadgold LC, Kuhn NJ (1979) Glucose-6-phosphate hydrolysis by lactating rat mammary-gland. *International Journal of Biochemistry* 10, 683-685.
310. Tothová C, Nagy O, Nagyová V, Kováč G. (2016) Serum protein electrophoretic pattern in dairy cows during the periparturient period, *J appl Anim Res*, 46:1, 33-38.
311. Trayhurn P, Richard D (1985) Brown adipose tissue thermogenesis and the energetics of pregnancy and lactation in rodents. *Biochem Soc Trans* 13, 826–828.
312. Uldry M, Ibberson M, Horisberger JD, Chatton JY, Riederer BM, Thorens B (2001) Identification of a mammalian H⁺-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO J.*;20:4467–4477.
313. ATM Van Knegsel, Van Den Brand H, Dijkstra J, Van Straalen WM, Heetkamp MJW, Tamminga S, Kemp B (2007) Dietray energy source in dairy cows in early lactation: Energy portioning and milk composition. *J. Dairy Sci.* 90.1467-1476.
314. Van de Ligt JLG, Lindemann MD, Harmon RJ, Monegue HJ, Cromwell GL (2002) Effect of chromium tripicolinate supplementation on porcine immune response during the periparturient and neonatal period *J. Anim. Sci.* 80:456–466.
315. Vernon RG, Faulkner A, Hay WW Jr, Calvert DT, Flint DJ (1990) Insulin resistance of hind-limb tissues in vivo in lactating sheep. *Biochemical Journal* 270, 783–786.
316. Vejrazkova D, Vcelak J, Vankova M, Lukasova P, Bradnova O, Halkova T, Kancheva R, Bendlova BJ (2014) *Steroid Biochem Mol Biol*;139:122-9.
317. Villalobos FAC, RomeroRMR, Tarrago C, Rasado A (1997) Supplementation with chromium picolinate reduce the incidence of placental retention in dairy cows. *Can J D Sci*, 77:329.
318. Vinson JA, Hsiao KH (1985) Comparative Effect of Various Forms of Chromium on Serum Glucose: An Assay for biologically active chromium. *Nutr Rep Int*, 32:1-5.

319. Vincent JB (1999) Mechanisms of chromium action: low-molecular-weight chromium-binding substance. *J Am Coll Nutr.* 1999 Feb;18(1):6-12.
320. Vincent JB (2000a) The biochemistry of Chromium. *Journal Nutrition.* 130: 715-718
321. Vincent JB (2000b) Elucidating a biological role for Chromium at a molecular level. *Accounts Chemistry Research,* 33: 503-510.
322. Vincent JB (2001) The bioinorganic chemistry of chromium(III). *Polyhedron* 20:1–26.
323. Vincent JB (2004) Recent advances in the nutritional biochemistry of trivalent chromium. *Proceedings of the Nutrition Society* 63, 41–47.
324. Vincent JB (2017) New Evidence against Chromium as an Essential Trace Element *J Nutr.*;147(12):2212-2219.
325. Vinson JA, Hsiao KH(1985) Comparative Effect of Various Forms of Chromium on Serum Glucose: An Assay for biologically active chromium. *Nutr Rep Int,* 32:1-5.
326. Von Burg R, Liu D(1993) Chromium and hexavalent chromium.*J ApplToxicol*;13:225-230.
327. Zachut M, Honig H, Striem S, Zick Y, Boura-Halfon S, Moallem U (2013) Periparturient dairy cows do not exhibit hepatic insulin resistance, yet adipose-specific insulin resistance occurs in cows prone to high weight loss. *J Dairy Sci.*96(6):5656–69.
328. Zhao FQ, Dixon WT, Kennelly JJ (1996) Localization and gene expression of glucose transporters in bovine mammary gland. *Comp. Biochem. Physiol.* 115: 127–34.
329. Zhao Z, Ksiezak H, Riggio S, Haroutunian V, Pasinetti GM (2006) Insulin receptor deficits in schizophrenia and in cellular and animal models of insulin receptor dysfunction *Schizophrenia Research , Volume 84 , Issue 1 , 1 – 14.*
330. Zhao FQ, Keating AF (2007). Expression and Regulation of Glucose Transporters in the Bovine Mammary Gland. *J D Sci* 90: E76-E86.
331. Zick Y (2005) Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. *Sci STKE.* 25(268):4.
332. Zima T, Mestek O, Tesar V, Tesarova P, Nemecek K, Zak A, Zeman M (1998) Chromium levels in patients with internal diseases, *biochem. Ml.Biol. Int.,* 46(2):365-374.

333. Zinpro P (2003) Chromium swine research indicates better reproductive performance by sows. *Trace Mineral Focus*, 9: 1-8.
334. Wallace RJ, McEwan NR, McIntosh FM, Teferedegne B, Newbold CJ (2002) Natural products as manipulators of rumen fermentation. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 15:1458-1468.
335. Wallach S, Verch, RL (1986) Radiochromium distribution in aged rats. *J. Am. Coll. Nutr.* 5:291-298.
336. Wang Q, Wang X, Evers BM (2003) *J Biol Chem*;278:51091–9.
337. Wang H, Kruszewski A, Brautigam DL (2005) Cellular chromium enhances activation of insulin receptor kinase, *Biochemistry*, 44: 8167–75.
338. Wang ZQ, Zhang XH, Russell JC, Hulver M, Cefalu WT (2006) Chromium picolinate enhances skeletal muscle cellular insulin signaling in vivo in obese, insulin resistant JCR:LA-cp rats, *J Nutr*,136: 415–20.
339. Wang MQ, Wang C, Du YJ, Li H, TaoWJ, Ye SS, He YD, Chen SY (2014) Effects of chromium-loaded chitosan nanoparticles on growth, carcass characteristics, pork quality, and lipid metabolism in finishing pigs, *Livest Sci*, 161:123–29.
340. Watson RT1, Pessin JE (2001) Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation *Recent Prog Horm Res.*;56:175-93.
341. Wilcox G (2005) Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev.* 26:19-39.
342. Williams B (1994) Insulin resistance: the shape of things to come. *Lancet.*; 344 (8921):521-4.
343. Wood IS, Trayhurn P (2003) Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br. J. Nutr.* 89:3-9.
344. Wrightt AJ, Mowatl DN и Mallard BA (1994) Supplemental chromium and bovine respiratory disease vaccines for stressed feeder calves *Can. J. Anim. Sci.* 74 287-295.
345. Yamaguchi SK, Sano, Shimojo N (1983) On the biological half-time of hexavalent chromium in rats. *Industr. Health* 21:25-34.
346. Yan T, Mayne CS, Keady TWJ, Agnew RE (2006) Effects of dairy cow genotype with two planes of nutrition on energy partitioning between milk and body tissue. *J. Dairy Sci.*;89:1031–1042.

347. Yang WZ, Mowat DN, Subiyatno A, Liptrap RM (1996) Effects of chromium supplementation on early lactation performance of Holstein cows. *Can. J. Anim. Sci.* 76:221-230.
348. Yang X, Palanichamy K, Ontko AC (2005) A newly synthetic chromium complex – chromium(phenylalanine)₃ improves insulin responsiveness and reduces whole body glucose tolerance. *FEBS Lett* 579: 1458-1464.
349. Yasui T, McArt JAA, Ryan CM, Gilbert RO, Nydam DV, Valdez F, Griswold KE, Overton TR (2014) Effects of chromium propionate supplementation during the periparturient period and early lactation on metabolism, performance, and cytological endometritis in dairy cows *J. Dairy Sci.* 97 :6400–6410.
350. Youngren JF (2007) Review Regulation of insulin receptor function *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 873 – 891

Биографија

Марија Пантелић (девојачко Игњатовић) је рођена 18. марта 1981. године у Земуну. Основну школу, а потом и средњу Пољопривредну школу ПК „Београд“ завршила је у Београду. Школске 2000/2001 уписала је основне студије на Факултету ветеринарске медицине, Универзитета у Београду који је завршила децембра 2007. године са просечном оценом 8,20. По завршетку основних студија обавља приправнички стаж на Катедри за болести копитара и месоједа Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду и 2009. године полаже стручни испит за дипломираног ветеринара.

Две године по завршетку основних студија, уписује докторске академске студије на Факултету ветеринарске медицине, Универзитета у Београду, на којима је положила све испите предвиђене студијским програмом са просечном оценом 9,20. Од 2011. године је запослена у Институту за нуклеарне науке „Винча“ у лабораторији за молекуларну биологију и ендокринологију на пројекту евиденционог броја III 41029 Министарства просвете, науке и технолошког развоја под називом „Дефинисање кластера молекулских биомаркера за побољшање и терапију поремећаја расположења“ Од 2012. до 2014. године активно је учествовала у међународном пројекту под називом: „Употреба радиопротектора нове генерације у циљу заштите и лечења организма од непосредног- акциденталног зрачења и њихов утицај на органске системе“ чији је руководилац био Др Герт Лубец, редовни професор и начелник лабораторије за протеомику Института за педијатрију Медицинског факултета Универзитета у Бечу.

Члан је Ветеринарске коморе Србије са лиценцом за обављање ветеринарске делатности.

До сада је објавила 11 научно-истраживачких радова у часописима међународног значаја (M22 и M23 категорије).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Марија М. Пантелић

Број индекса 2010/5007

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Утицај пероралне апликације хрома на ендокрини и метаболички статус крва холштајн расе“

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марија М. Пантелић

Број индекса 2010/5007

Студијски програм докторске академске студије

Наслов рада „Утицај пероралне апликације хрома на ендокрини и метаболички статус крвава холштајн расе“

Ментор Проф. др Данијела Кировски и др Горан Корићанац

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора

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 пероралне апликације хрома на ендокрини и метаболички статус крвава 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 Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално(CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада(CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада(CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима(CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____
