

**FREKVENCIJA MUŽE I NJEN UTICAJ NA POIZVODNE I METABOLIČKE
KARAKTERISTIKE KRAVA
MILKING FREQUENCY AND ITS INFLUENCE ON DERIVATIVE AND METABOLIC
CHARACTERISTICS OF COWS**

Srđan Krnjaić^{a*}, Radojica Djoković^b, Miloš Ž. Petrović^b, Mira Majkić^a, Jože Starič^c

^aDepartman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Srbija

^bAgronomski fakultet Čačak, Srbija

^cVeterinarski fakultet Ljubljana, Slovenija

*Autor za korespondenciju: srdjankrnjaic66@gmail.com



R.DJ. <https://orcid.org/0000-0003-0900-3227>, M.Ž.P. <https://orcid.org/0000-0002-4707-6796>, M.M. <https://orcid.org/0009-0007-0110-7327>,
J.S. <https://orcid.org/0000-0002-5156-5277>

SAŽETAK

Povećanje učestalosti muže može ad poveća proizvodnju mleka kod krava za 15-20%, a povećana frekvencija muže može uticati na različite mehanizme sekretone i metaboliček aktivnosti vimena. Krave se u praksi najviše mazu dva puta dnevno sa prosečnim razmakom između dve muže od 12 sati, a u praksi je to najčešći raspon od 8-16 sati. Pokazano je da razmak od 12 časova između dve muže je bio dobar kod visokoproduktivnih krava, sa stabilnim rastom u proizvodnji mleka tokom prve polovine laktacije. Produžetak interval između dve muže dovede do inhibicije laktacije sa posledičnim opadanjem količine proizvedenog mleka. Povećanje učestalosti muže mlečnih goveda na više od dve muže dnevno rezultira povećanjem proizvodnje mleka. Sprovođenje muže tri puta dnevno dovodi do povećanja proizvodnje mleka od 3 do 39% u poređenju sa dvokratnom mužom. Jedan od najočiglednijih efekata kao rezultat povećane učestalosti muže je mobilizacija telesnih rezervi. Primarni mehanizam koji dovodi do ovoga je lipoliza. Kao rezultat lipolize dolazi do porasta koncentracije NEFA i BHB u krvnoj plazmi odnosno serumu uz opadanje ocenjene telesne kondicije krava, a navedene promene se smatraju tipičnim odgovorom na povećanje frekvencije muže. U ogledima je pokazano značajno opadanje ocene telesne kondicije kod krava koje se mazu šestokratno u odnosu na trokratno mužene krave. Povećana lipoliza i ketogeneza dovode do metaboličkog odgovora i adaptiranja krava, a te promene nekada mogu dovesti do povećanja rizika za nastanak ili pak povećanu prevalenciju metaboličkih bolesti u stadima krava.

Ključne reči: krave, frekvencija muže, proizvodnja mleka, metabolička adaptacija.

ABSTRACT

Increasing milking frequency can increase milk production in cows by 15-20%, and increased milking frequency can affect different mechanisms of secretion and metabolic activity of the udder. In practice, cows are best milked twice a day with an average interval between two milkings of 12 hours, and in practice it is the most common range of 8-16 hours. It was shown that a 12-hour interval between two milkings was good for high-yielding cows, with a steady increase in milk production during the first half of lactation. An extended interval between two milkings will lead to inhibition of lactation with a consequent decrease in the amount of milk produced. Increasing the milking frequency of dairy cattle to more than two milkings per day results in an increase in milk production. Milking three times a day leads to an increase in milk production of 3 to 39% compared to milking twice. One of the most obvious effects as a result of increased milking frequency is the mobilization of body reserves. The primary mechanism leading to this is lipolysis. As a result of lipolysis, there is an increase in the concentration of NEFA and BHB in the blood plasma or serum with a decrease in the assessed body condition of the cows, and the mentioned changes are considered a

typical response to an increase in milking frequency. The tests showed a significant decrease in the body condition score in cows that were milked six times compared to cows that were milked three times. Increased lipolysis and ketogenesis lead to a metabolic response and adaptation of cows, and these changes can sometimes lead to an increase in metabolic diseases in cow herds.

Key words: cow, milking frequency, milk production, metabolic adaptation.

FREKVENCIJA MUŽE KAO ZNAČAJAN FAKTOR U POSTIZANJU BOLJE PROIZVODNJE MLEKA

Povećana proizvodnja mleka za sobom povlači selekciju krava koje imaju određene osobine laktacione krive, ali i morfološke osobine vimena. Dobro struktuisano i veliko vime omogućuje visoku proizvodnju mleka, a zaključeno je da maksimalni potencijal krave mogu ispoljiti pomoću tehnoloških postupaka kao što je povećana frekvencija muže ili u novije vreme uvođenje muznih robota. Ipak, da bi se povećala proizvodnja na adekvatan način potrebno je bilo proučiti veze između stvaranja mleka, lučenja mleka, morfoloških osobina vimena i optimalnog rasporeda muže (1-11). Povećanje učestalosti muže može ad povećati proizvodnju mleka kod krava za 15-20%, a povećana frekvencija muže može uticati na različite mehanizme sekrecije i metaboličke aktivnosti vimena. Krave se u praksi najčešće muzu dva puta dnevno sa prosečnim razmakom između dve muže od 12 sati, a u praksi je to najčešći raspon od 8-16 sati. U prvim istipivanjima vršeno je da li vremenski intervali između dve muže mogu uticati na proizvodnju mleka. Pokazano je da razmak od 12 časova između dve muže je bio dobar kod visokoproduktivnih krava, sa stabilnim rastom u proizvodnji mleka tokom prve polovine laktacije. Međutim promena intervala muže, tačnije produžetak dovede do inhibicije laktacije sa posledničnim opadanjem količine proizvedenog mleka. Pokazalo se da postoji veliko intraindividualno variranje kada je u pitanju interval između dve muže koji neka jedinka može da toleriše a da ne dođe do inhibicije produktivnosti usled promene intervala. Tada se shvatilo da je potrebno birati one krave koje imaju velike cisterne vimena i koje mogu da skladište velike količine mleka. Danas postoji veći broj tehnologija za snimanje kapaciteta cisterne vimena kako bi se izvršilo objektivno merenje i odabir najkvalitetnijih jedinki. Što je cisterna vimena veća, proizvodiće se veća količina mleka, uz veću toleranciju promene frekvencije muže. Sa druge strane kod životinja koje imaju male

cistern, one ne mogu da preiseu alveolarno mleko tako lako, kada se stvara refleksna kočnica sekrecije mleka, a proizvodnja mleka lako opada kod promenljivog interval između dve muže. Eksperimentom je pokazano da što su uslovi za neprekidno isticanje mleka iz alveolarnog delja bolji, to je proizvodnja mleka veća. Zbog toga je povećanje frekvencije muže jedan od osnovnih načina za povećanje proizvodnje mleka.

Povećanje učestalosti muže mlečnih goveda na više od dve muže dnevno rezultiralo je povećanjem proizvodnje mleka (12-21). Sprovođenje muže tri puta dnevno dovodi do povećanja proizvodnje mleka od 3 do 39% u poređenju sa dvokratnom mužom kod krava muzara, 15-35% kod ovaca i 10-20% kod koza. Najveći prinosi pri primeni trokratne muže postojali su kod visokoproduktivnih primiparnih krava u odnosu na multiparne, a gledano sa aspekta perioda laktacije najveći prinosi se dobijaju prilikom aplikacije trokratne muže u kasnijim fazama laktacije. Veliki broj istraživanja je pokazao da prelazak sa dvokratne na trokratnu mužu rezultira stabilnim povećanjem mleka od oko 3,5 kg po danu, a da taj porast uglavnom nije proporcionalno povećan. Trokratna muža je, vrlo verovatno, biološki optimalna frekvencija muže, jer je pokazano da krave koje su držane slobodno i koje su samoinicijativno prilazile robotu za mužu su to činile od 2,7 do 3,9 puta na dan. Povećanje frekvencije muže će dovesti do povećane proizvodnje mleka u zavisnosti od toga koliko dugo se primenjuje određena frekvencija muže. Tako recimo kod primene četvorokratne muže u period od mesec dana primećen je porast proizvodnje mleka od 14%, prelazak na šestokratnu mužu dovede do porasta od 10 do 15% u roku od samo dva dana. Navedeni podaci ukazuju da povećanje frekvencije muže na 4 putadnevno omogućuje dosta visok, a lagan porast porast, dok dalje povećanje frekvencije daje porast ali ne toliko veliki kao kod četvorokratne muže. Ovo je potvrđeno kako kod krava, tako i kod malih preživara. Pored povećanja količine proizvedenog mleka postoje i promene u sastavu mleka ali su nalazi vezani za sastav mleka

kontradiktorne. Pojedini autori su našli minorne i statistički nesignifikantne promene u biohemijskom sastavu mleka, dok su pojedini istraživači našli smanjenje mlečne masti u odnosu na standardnu dvokratnu mužu. Takođe rezultati su kontradiktorni i sa aspekta činjenice da li su promene izraženije kod krava koje su primirparne ili multiparne. Primećen je blagi pad proteina i kazeina u mleku koji je bio toliki da je prinos sira od tog mleka bio manji za oko 1,5%. Broj somatskih ćelija kao indikator zdravlja vimena i mikrobiološkog kvaliteta mleka je opadao sa povećanjem frekvencije muže. Dakle povećanje frekvencije muže može da poboljša zdravlje vimena i higijenske parametre mleka. Povećanje frekvencije muže stimuliše sekreciju laktogenih hormona koji dalje omogućavaju bolju perzistenciju laktacije, jer pomenuti hormone povećavaju broj sekretornih ćelija i samim tim zapreminu izlučenog mleka. Invulucija vimena uz apoptozu ćelija se biološki depava sa napredovanjem laktacije, ali se aktivnost preostalih ćelija održava na visokom nivou, a smanjenje broja ćelija je modifikovano učestalošću muže. Takođe, povećanjem frekvencije muže povećava se proliferativni kapacitet novih ćelija, a nađena je i povećana enzimatska aktivnost ćelija što ukazuje na povećanu spremnost ćelija na novu sintezu mleka, što je dokazano kod krava i koza.

Posledice smanjenja broja muža na proizvodnju mleka preživara proučavali su mnogi autori (22-31). Prelazak sa dvokratne na jednokratnu mužu ndovodi do opadanja proizvodnje mleka u rasponu od 10 do čak 50% kod mlečnih krava. Čak i kratkotrajni prelazak sa dve muže na jednu dovelo je do opadanja proizvodnje mleka za 10-25% kod Holštajn-frizijskih krava koje su bule u sredini laktacije. Istraživanja su potvrdila da je period laktacije u kom se smanjuje frekvencija muže veoma bitna, pa tako količina mleka opada za 38% u ranoj laktaciji, odnosno za 28% u kasnoj laktaciji. Ovakav nalaz je logičan, jer u ranoj laktaciji proizvodnja mleka mnogo više zavisi od različitih faktora spoljašnje sredine u odnosu na kasnije periode laktacije. Promene u količini proizvedenog mleka zavisiće od udela mleka u mlečnoj žlezdi, odnosno od kapaciteta cistern da prihate mleko. Istraživanja sprovedena na ovcama pokazuju da ovce sa velikim kapacitetom skladištenja mleka dolazi do mnogo manjih gubitaka u proizvodnji mleka, u odnosu na ovce koje sui male slab kapacitet skladištenja mleka, što je dobijeno poređenje rase ovaca sa sardinije ili kod kanarskih koza koje imaju veliki kapacitet cistern i nekih alpskih rasa ovaca ili pojedinih rasa

koza sa malim kapacitetom rezervoara. Na osnovu svega zaključujemo da je smanjenje učestalost muže uzrok opadanja proizvodnje mleka, a da to zavisi od skladišnog kapaciteta životinje. Sa smanjenjem frekvencije muže češće dolazi do porasta broja somatskih ćelija, dok promene u hemijskom sastavu mleka sa aspekta proteina i masti najčešće nisu značajne, osim kod koza gde je zabeležen porast mlečne masti i kazeina u mleku posle smanjenja frekvencije muže. Postoji nekoliko značajnih mehanizama koji se aktiviraju sa smanjenjem frekvencije muže, odnosno sa povećanjem vremena između dve muže i oni uključuju: povećanje alveolarne distenzije, smanjenje protoka krvi u vimenu, povećanje propustljivosti čvrstog spoja i akumulacija inhibitora laktacije.

DVOKRATNA I TROKRATNA MUŽA I METABOLIČKA ADAPTACIJA KRAVA U RAZLIČITIM PERIODIMA LAKTACIJE

U cilju postizanja visoke proizvodnje mleka i maksimiziranja potencijala do kojih se dolazi genskom selekcijom uvođenje tehnoloških manipulacija koje znače povećanje frekvencije muže deluje opravdano. Veliki broj istraživanja pokazao je kako prelazak sa dvokratne na trokratnu mužu utiče na produktivnost kod krava (32-42). Kod krava muženih trokratno dobija se povećanje proizvodnje mleka od 1,72 kg po danu u odnosu na iste krave koje su mužene dvokratno. Ovakvo povećanje u proizvodnji mleka dovelo je opadanja telesne kondicije tako da je mlečna kondicija bila još izraženija. Povećao se i prinos proteina u mleku za oko 0,15 kg/dan kod trokratno muženih krava u odnosu na dvokratno mužene jedinke, a on prati povećanu proizvodnju mleka. U navedenim istraživanjima porasla je i proizvodnja mlečne masti kod trokratno pomuženih krava. Povećanje prinosa masti u jendom ogledu zavisilo je od povećanja prinosa mleka posle aplikacije trokratne muže na jedinke koje se mzu dvokratno. Tako je povećanje prinosa mleka od 3,46 kg/dan dovelo do povećanja prinosa masti od 0,05 kg/dan, a kada je povećanje prinosa pomuženog mleka bilo 3,69 kg/dan postojalo je mnogo veće povećanje mlečne masti od 0,11 kg/dan. Međutim, ostaje otvoreno pitanje na koji način frekvencija muže utiče na unos hrane i da li povećanje frekvencije muže može koje prati povećane prinose mleka i njegovih ingredijenata možeda bude ispraćeno adekvatnim unosom hrane ili se povećavaju homeoretski mehanizmi. Ovo je

pitanje koje se našlo u okviru našeg istraživanja, gde će energetske bilans krava koji je povezan sa unosom hrane biti ispitan kao poseban faktorijel kod krava u dvokratnoj i trokratnoj muži i u različitim periodima laktacije. U jednoj velikoj meta-analizi pokazano je da postoji umerena heterogenost u promeni vrednosti mlečnih proteina i masti, a nađena je visoka heterogenost kada se radi o unosu suve materije hrane. Kada se izvrši pristranost analiza, nije nađena pristranost za ispitivane parametre, ali su autori primetili postojanje blage pristranosti što ukazuje da, sagledano sa aspekta velikog broja istraživanja, postoji povezanost proizvodnje mleka i mlečne masti u funkciji frekvencije muže.

Jedan od najočiglednijih efekata kao rezultat povećane učestalosti muže je mobilizacija telesnih rezervi (43–47). Već smo napomenuli ranije da sa porastom frekvencije muže opada telesna kondicija. Primarni mehanizam koji dovodi do ovoga je lipoliza. Kao rezultat lipolize dolazi do porasta koncentracije NEFA i BHB u krvnoj plazmi odnosno serumu uz opadanje ocenjene telesne kondicije krava, a navedene promene se smatraju tipičnim odgovorom na povećanje frekvencije muže. U ogleđima je pokazano značajno opadanje ocene telesne kondicije kod krava koje se muzu šestokratno u odnosu na trokratno mužene krave. Suprotno, sa opadanjem frekvencije muže nađen je porast telesne kondicije kao i njeno slabije opadanje, što je posebno izraženo kod primene muže jednom dnevno. Promene u metabolizmu koje nastaju sa povećanjem frekvencije muže predstavljaju sastavni deo složenih homeoretskih prestrojanja koje smo ranije opisali. Metaboličke promene zavise od koordinacije perifernih signala, hranljivih materija i hormona, sa lokalnim regulatornim mehanizmima koji prilagođavaju stope dostupnosti hranljivih materija tako da odgovaraju sintetičkim kapacitetima epitelnih ćelija mlečne žlezde, što zapravo predstavlja homeorezu. Tako je kod krava koje se muzu višekratno nađena povećana koncentracija hormona rasta uz porast koncentracije prolaktina i oksitocina, a opadala je vrednost insulina. Hormonski status krava potvrđuje da povećanje frekvencije muže (u ogleđu u kom je merena koncentracija hormona radio se o šestokratnoj muži dnevno) dovodi do tipičnog endokrinološkog prestrojanja karakterističnog za homeorezu koja se vidi prilikom prelaska iz perioda zasušenja u period laktacije. Kod ispitivanih krava nađen je porast vrednosti IGF-I, što ukazuje na anaboličke efekte hormona rasta na periferna tkiva. Pored sistemskih

efekata i promena, postoje i promene u samoj mlečnoj žlezdi, gde je nađen porast aktivnosti različitih enzima uz porast sinteze laktoze kao i genskog materijala koji učestvuje u formiranju korisnih enzima za produkciju mleka. Poređenjem metaboličkih parametara kod krava koje se muzu šest puta dnevno u odnosu na trokratno mužene krave nađena je značajno viša koncentracija BHB i NEFA ali i niža koncentracija glukoze. Iako se ovde radi o dosta velikom povećanju frekvencije muže, gotovo identični rezultati su dobijeni kada se prelazi sa jednokratne na dvokratnu mužu. U oba slučaja postojalo je povećane prinosa mleka koji nije bio adekvatno ispraćen povećanjem energetske unosa poreklom iz hrane.

Na osnovu svega navedenog zaljučujemo da lipoliza i ketogeneza predstavljaju značajne mehanizme prestrojanja celokupnog metabolizma krava prilikom započinjanja laktacije, pa je sagledavanje veze metabolita sa parametrima lipolize i ketogeneze najpogodniji način da se utvrdi na koji način povećana frekvencija muže utiče na metaboličku adaptaciju kod krava. Rezultati naših istraživanja (48) pokazuju sledeće:

Frekvencija muže je imala statistički značajan uticaj na nivou $p < 0,01$, osim za ALB gde je uticaj utvrđen na nivou $p < 0,05$ za sledeće ispitivane parametre NEFA, BHB, GLU, TBIL, AST, GGT, Ca, ALB, INS, T4 i kortizol (CORT). Srednje vrednosti parametara kod krava u dvokratnoj u odnosu na krave u trokratnoj muži iznosile su: NEFA (0,45: 0,66 mmol/L), BHB (0,47: 1,16 mmol/L), GLU (2,66:2,38 mmol/L), TBIL (6,82: 9,54 μ mol/L), AST (34,5: 48,8 U/L), GGT (11,5: 16,2 U/L), Ca (2,63: 2,13 mmol/L), ALB (32,35: 29,96 g/L), INS (4,91: 4,15 mU/L), T4 (38,09: 28,64 nmol/L) i CORT (12,78: 18,32 nmol/L). Rezultati ispitivanja pokazuju da kod krava u trokratnoj muži postoji viša koncentracija NEFA, BHB, TBIL, AST, GGT i CORT, a niža koncentracija GLU, Ca, ALB, INS i T4 u odnosu na krave u dvokratnoj muži.

Period laktacije je pokazao značajan uticaj na najveći broj ispitivanih parametara na nivou $p < 0,01$ i to za NEFA, BHB, GLU, CHOL, TGC, TBIL, AST, GGT, TPROT, ALB, UREA, INS, RQUICKIBHB, T3, T4 i kortizol (CORT). Dinamika u promeni izmerenih koncentracija u sva tri perioda laktacije od rane ka stabilnoj za parametre kod kojih je utvrđena statistički signifikantna značajnost podrazumevala je sledeće: NEFA (0,83: 0,44: 0,39 mmol/L), BHB (1,12: 0,7: 0,62 mmol/L), GLU (2,21: 2,58: 2,8 mmol/L), CHOL (3,23: 3,85: 4,26 mmol/L), TGC

(0,12: 0,14: 0,15 mmol/L), TBIL (11,71: 7,52: 5,3 μ mol/L), AST (59,69: 38,4: 26,84 IU/L), GGT (19,9: 12,8: 8,96 IU/L), TPROT (65,85: 70,0: 71,53 g/L), ALB (26,89: 32,7: 33,87 g/L), UREA (5,86: 4,63: 4,52 mmol/L), INS (3,71: 4,83: 5,05 mU/L), RQUICKIBHB (0,51: 0,63: 0,62), T3 (0,79: 1,05: 1,04 nmol/L), T4 (26,16: 35,59: 38,35 nmol/L) i CORT (18,28: 13,86: 14,51 nmol/L). Na osnovu rezultata zaključujemo da je koncentracija NEFA, BHB, TBIL, AST, GGT, UREA i CORT viša u ranoj laktaciji a da potom opada, dok je vrednost TPROT, ALB, INS, RQUICKIBHB, T3 i T4 niža u ranoj laktaciji a da potom postepeno raste.

Od velikog značaja je interakcija frekvencije muže i perioda laktacije. Signifikantan uticaj interakcije ova dva faktora ukazuje na to da oba faktora paralelno pokazuju uticaj na metaboličku adaptaciju karva. Interakcija frekvencije muže i perioda laktacije značajno utiče na vrednosti NEFA i BHB, tako da kod krava u trokratnoj muži postoji viša vrednost ovih parametara, koja je još više raste u ranoj laktaciji u odnosu na krave u dvokratnoj muži. Sličnu dinamiku pokazali su TBIL kao i enzimi jetre AST i GGT.

Najveći broj ispitivanih metaboličkih parametara pokazuje mnogo veću povezanost sa NEFA u trokratnoj muži u odnosu na dvokratnu. To znači da su vrednosti i varijabilnost ispitivanih parametara mnogo više determinisani vrednostima NEFA (viša vrednost koeficijenta determinacije R^2) kod krava u trokratnoj u odnosu na dvokratnu mužu. Koeficijenti determinacije u trokratnoj i dvokratnoj muži imali su sledeće vrednosti za ispitivane parametre: GLU (0,63: 0,074), CHOL (0,292: 0,016), TGC (0,29: 0,022), TBIL (0,666: 0,022), AST (0,666: 0,02), Mg (0,132: 0,032), TPROT (0,234: 0,007), ALB (0,364: 0,002), UREA (0,243: 0,046), INS (0,35: 0,017), RQUICKIBHB (0,355: 0,082), T3 (0,312: 0,000), T4 (0,187: 0,004) i CORT (0,272: 0,026). Pored navedenog, vrednost regresionog parametra b ukazuje da promena vrednosti svakog od ispitivanih metabolita po jedinici NEFA je mnogo izraženija kod krava u trokratnoj u odnosu na dvokratnu mužu, što ukazuje da postoji veća osetljivost krava na lipolizu ukoliko se poveća frekvencija muže.

Korelaciona i regresiona analiza pokazuje da postoji razlika u metaboličkoj adaptaciji na ketogenezu, odnosno vrednost BHB u zavisnosti od toga da li se krave muzu dvokratno ili trokratno, što je prikazano na grafikonima 19-36. Koeficijent determinacije između ispitivanih parametara i BHB

bio je viši kod krava u trokratnoj muži: GLU (0,639: 0,082), CHOL (0,453: 0,046), TGC (0,502: 0,054), TBIL (0,549: 0,215), AST (0,565: 0,217), GGT (0,565: 0,217), P (0,128: 0,001), Mg (0,179: 0,039), TPROT (0,430: 0,036), ALB (0,356: 0,011), UREA (0,251: 0,132), INS (0,375: 0,079), RQUICKIBHB (0,379: 0,029), T3 (0,240: 0,058), T4 (0,204: 0,023) i CORT (0,442: 0,053). Promena vrednosti metaboličkih parametara za svaku jedinicu BHB odnosno regresioni parametar b ukazuju da nije bilo velikog odstupanja u promeni koncentracije metabolita za svaku jedinicu BHB u trokratnoj u odnosu na dvokratnu mužu posmatrajući sa aspekta celokupne laktacije.

Dobijeni rezultati pokazuju da sa povećanjem frekvencije muže metabolička adaptacija kod krava u znatnijoj meri zavisi od lipolize i ketogeneze. Promena vrednosti metaboličkih parametara u trokratno u odnosu na dvokratnu mužu je mnogo veća sa porastom lipolize (vrednost NEFA) u odnosu na porast ketogeneze (vrednost BHB).

MF, EB, LP i MF $\times$ EB su pokazali značajne efekte na metaboličke parametre, dok drugi MF $\times$ LP i trosmerna interakcija MF $\times$ EB $\times$ LP nisu pokazali značajne efekte na većinu parametara krvi.

Na osnovu ispitivanih biohemijskih parametara krvi moguće je razlikovati krave u ranoj laktaciji u odnosu na srednju i kasnu laktaciju, delimično se razlikuju krave prema energetsom bilansu, ali nije moguće razlikovati krave u dvokratnoj i trokratnoj. Međutim, kada se krave klasifikuju na osnovu interakcije eneretskog bilansa i muže dobijamo klastere, gde se najviše izdvaja klaster krava koje se muzu trokratno i nalaze se u negativnom energetsom bilansu, koji se delimično preklapa sa kravama u dvokratnoj muži i negativnom energetsom bilansu i ne poklapa se sa klasterima krava koje su u pozitivnom energetsom bilansu. Navedeni podaci ukazuju da trokratna muža i negativni energetski bilans dovode do značajnih metaboličkih odstupanja kod mlečnih krava.

Vrednost pojedinačnih krvnih parametara ispitana je u funkciji perioda laktacije, EB, frekvencije muže i interakcije frekvencije muže i eneretskog bilansa. Period laktacije je uticao na sve ispitivane parametre osim na vrednosti Ca i P. U ranoj laktaciji postoji viša vrednosti NEFA, BHB, AST, GGT, TBIL, UREA i CORT, a niža vrednost GLU, CHOL, TGC, TPROT, ALB, INS, RQUICKIBHB, T3 and T4. Frekvencija muže je uticala na sve parametre osim na CHOL, TGC, P, TPROT, ALB i UREA. Kod krava u trokratnoj muži

nađena je viša vrednost NEFA, BHB, AST, GGT, TBIL i CORT, a niža vrednost GLU, Ca, INS i T4. Energetski bilans je pokazao uticaj na sve ispitivane faktore, osim na Ca. Krave u negativnom energetskom bilansu pokazuju viša vrednosti NEFA, BHB, AST, GGT, TBIL, UREA i CORT, a niža vrednost GLU, CHOL, TGC, TPROT, ALB, P, INS, RQUICKI, T3 and T4. Interakcija frekvencija mužje × energetski bilans je uticao na sve odabrane parametre osim na Ca, APB, UREA i T4. Nađeno je da kod krava u trokratnoj mužji i negativnom energetskom bilansu postoji viša koncentracija NEFA, BHB, AST, GGT, TBIL i CORT, a niža vrednost GLU, CHOL, TGC, TPROT, P, INS, RQUICKIBHB i T3 u odnosu na krave u dvokratnoj mužji i negativnom energetskom bilansu i krave u pozitivnom energetskom bilansu.

Efekti EB, NEFA i BHB na krvne parametre razlikovali su se u funkciji frekvencije mužje i energetskog bilansa kod krava. Postoje vrlo jake korelacione veze kod krava u trokratnoj mužji i negativnom energetskom bilansu, i potom opadaju tako da su nešto slabije kod krava u dvokratnoj mužji i negativnom energetskom bilansu, još slabije kod krava u trokratnoj mužji i pozitivnom energetskom bilansu, a mnoge veze se potpuno gase kod krava u dvokratnoj mužji i pozitivnom energetskom bilansu. Poređenjem koeficijenata korelacije zaključujemo da EB, NEFA i BHB značajno više koreliraju sa metaboličkim parametrima kod krava u trokratnoj mužji i negativnom energetskom bilansu ($R=0,78-0,95$) u odnosu na grupu dvokratna mužja i negativni energetski bilans ($R=0,56-0,79$), kao i u odnosu na grupu trokratne mužje ($R=0,35-0,59$) i dvokratne mužje ($R=0,06-0,31$) koje su u pozitivnom energetskom bilansu. Negativni energetski bilans dovodi do značajno veće povezanosti metaboličkih parametara sa EB, NEFA i BHB kod krava u trokratnoj mužji u odnosu na ostale ispitivane grupe. Određeni parametri, kao što su Ca i P ne pokazuju nikakvu vezu sa EB, NEFA i BHB bez obzira na grupu krava. Zaključujemo da kod krava u trokratnoj mužji postoji mnogo izraženija lipoliza i ketogeneza (više vrednosti NEFA i BHB) sa opadanjem

vrednosti EB. U trokratnoj mužji je ketogeneza mnogo intenzivnija (porast BHB) sa razvojem lipolize (porast NEFA).

Pored jačine veze od velikog značaja je određivanje nagiba regresione krive kako bi se utvrdilo koliko se metabolički parametri menjaju u funkciji vrednosti EB, NEFA i BHB kod krava u dvokratnoj i trokratnoj mužji koje su u pozitivnom i negativnom energetskom bilansu. Relativni efekat EB, NEFA i BHB na parametre je različit i zavisi od grupe životinja i od parametara na koji deluju. Kod krava u negativnom energetskom bilansu vrednost GLU, CHOL, TGC, značajno više zavisi od vrednosti EB. Kod krava u trokratnoj mužji i negativnom bilansu vrednosti TBIL, AST i GGT značajno više zavise od EB u odnosu na ostale grupe krava. Vrednost TPROT i ALB značajno više zavisi od EB kod krava u pozitivnom bilansu, dok vrednost UREA više zavisi kod krava u negativnom energetskom bilansu. INS značajno više zavisi od EB kod krava u dvokratnoj mužji i pozitivnom bilansu, dok vrednost T3 značajno više zavisi od EB samo kod krava u trokratnoj mužji. RQUICKIBHB pozitivno odstupa sa porastom EB kod krava u negativnom bilansu. Kortizol opada sa porastom vrednosti EB, što je najizraženije kod krava u trokratnoj mužji i pozitivnom energetskom bilansu, dok nema efekta kod krava koje se muzu dvokratno i nalaze se u pozitivnom bilansu. Vrednosti GLU, CHOL, TGC, TPROT, ALB, INS, T3, T4 opadaju, a vrednosti AST, GGT, TBIL, UREA i CORT rastu sa porastom NEFA i BHB. Zavisnost TGC, TBIL, AST, GGT i CORT od NEFA je veća kod krava sa trokratnom mužjom bez obzira na energetski bilans, dok je zavisnost GLU, UREA, INS i T4 od NEFA veća kod krava u negativnom energetskom bilansu bez obzira na frekvenciju mužje. RQUICKIBHB više zavisi od NEFA kod krava u pozitivnom energetskom bilansu. Zavisnost odabranih krvnih parametara od BHB pokazuje ujednačenost bez obzira na energetski bilans i frekvenciju mužje, s tim što zavisnost opada kod krava u dvokratnoj mužji i pozitivnom energetskom bilansu u odnosu na druge grupe krava.

ACKNOWLEDGEMENT

This paper was created as a result of research within the "Agreement on the transfer of funds for the financing of scientific research work of teaching staff at accredited Higher Education Institutions in 2024, contract registration number: 451-03-65/2024-03/ 200117".

LITERATURA

1. Knight C.H., Hirst D., Dewhurst R.J. Milk accumulation and distribution in the bovine udder during the interval between milkings. *The Journal of Dairy Research*. 1994, 61:167-177
2. Davis S.R., Farr V.C., Copeman P.J.A., Carruthers V.R., Knight C.H., Stelwagen K. Partitioning of milk accumulation between cisternal and alveolar compartments of the bovine udder: Relationship to production loss during once daily milking. *The Journal of Dairy Research* 1998, 65:1-8
3. Ayadi M., Caja G., Such X., Knight C.H. Use of ultrasonography to estimate cistern size and milk storage at different milking intervals in the udder of dairy cows. *The Journal of Dairy Research* 2003, 70:1-7
4. Eslamizad M., Dehghan-Banadaky M., Rezayazdi K., Moradi-Shahrbabak M. Effects of 6 times daily milking during early versus full lactation of Holstein cows on milk production and blood metabolites. *Journal of Dairy Science* 2010, 93(9):4054-4061
5. Ruberte J., Carretero A., Fernandez M., Navarro M., Caja G., Kirchner F., et al. Ultrasound mammography in the lactating ewe and its correspondence to anatomical section. *Small Ruminant Research* 1994, 13:199-204
6. Caja G., Such X., Ruberte J., Carretero A., Navarro M. The use of ultrasonography in the study of mammary gland cisterns during lactation in sheep. In: *Proceedings of the International Symposium on Milking and Milk Production of Dairy Sheep and Goats*. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Pers; 1999. pp. 91-93
7. Caja G., Salama O.A., Fathy A., El-Sayed H., Salama A.A.K. Milk partitioning and accumulation in the camel udder according to time elapsed after milking. In: *Proceedings of the 62nd Annual Meeting of EAAP*. Stavanger; 2011. p. 363
8. Castillo V., Such X., Caja G., Salama A.A., Albanell E., Casals R. Changes in alveolar and cisternal compartments induced by milking interval in the udder of dairy ewes. *Journal of Dairy Science* 2008, 91:3403-3411
9. Rovai M., Caja G., Such X. Evaluation of udder cisterns and effects on milk yield of dairy ewes. *Journal of Dairy Science* 2008, 91:4622-4629
10. Marnet P.G., McKusick B.C. Regulation of milk ejection and milkability in small ruminants. *Livestock Production Science* 2001, 70:125-133
11. Stelwagen K., Knight C.H., Farr V.C., Davis S.R., Prosser C.G., McFadden T.B. Continuous versus single drainage of milk from the bovine mammary gland during a 24 hour period. *Experimental Physiology* 1996, 81:141-149
12. Stelwagen K., Knight C.H. Effect of unilateral once or twice daily milking of cows on milk yield and udder characteristics in early and late lactation. *The Journal of Dairy Research* 1997, 64:487-494
13. Peaker M., Blatchford D.R. Distribution of milk in the goat mammary gland and its relation to the rate and control of milk secretion. *The Journal of Dairy Research* 1988, 55:41-48
14. Stelwagen K. Effect of milking frequency on mammary functioning and shape of the lactation curve. *Journal of Dairy Science* 2001, 84, E204-E211
15. Klei L.R., Lynch J.M., Barbano D.M., Oltenacu P.A., Lednor A.J., Bandler D.K. Influence of milking three times a day on milk quality. *Journal of Dairy Science*, 1997, 80:427-436
16. Erdman R.A., Varner M. Fixed yield responses to increased milking frequency. *Journal of Dairy Science* 1995, 78:1199-1203
17. Ipema A.H. Integration of robotic milking in dairy housing systems review of cow traffic and milking capacity aspects. *Computers and Electronics in Agriculture* 1997, 17:79-94
18. Knight C.H., Wilde C.J. Mammary cell changes during pregnancy and lactation. *Livestock Production Science* 1993, 35:3-19
19. Allen D.B., DePeters E.J., Laben R.C. Three times a day milking: Effects on milk production, reproductive efficiency and udder health. *Journal of Dairy Science* 1986, 69:1441-1446
20. Knight C.H., Foran D., Wilde C.J. Interactions between autocrine and endocrine control of milk yield; thrice-daily milking of bromocriptine-treated goats. *Journal of Reproduction and Fertility* 1990, 5. Abstract. no. 30
21. Alshaikh M.A., Salah M.S. Effect of milking interval on secretion rate and composition of camel milk in late lactation. *The Journal of Dairy Research* 1994, 61:451-456
22. Davis S.R., Farr V.C., Stelwagen K. Regulation of yield loss and milk composition during once-daily milking: A review. *Livestock Production Science* 1999, 59:77-94
23. Molenaar A., Leath S.R., Caja G., Henderson H.V., Cameron C., Challies M., et al. Development of ultrasound methodology to measure cow udder cistern storage capacity in the new Zeland pasture-fed context. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 2013, 73:114-116
24. Stelwagen K., Knight C.H., Farr V.C., Davis S.R., Prosser C.G., McFadden T.B. Continuous versus single drainage of milk from the bovine mammary gland during a 24 hour period. *Experimental Physiology* 1996, 81:141-149

25. Ayadi M., Hammadi M., Khorchani T., Barmat A., Atigui M., Caja G. Effects of milking interval and cisternal udder evaluation in Tunisian Maghrebi dairy dromedaries (*Camelus dromedarius* L.). *Journal of Dairy Science* 2009, 92:1452-1459
26. Salama A.A.K., Such X., Caja G., Rovai M., Casals R., Albanell E., et al. Effects of once versus twice daily milking throughout lactation on milk yield and milk composition in dairy goats. *Journal of Dairy Science* 2003, 86:1673-1680
27. Wilde C.J., Knight C.H., Addey C.V.P., Blatchford D.R., Travers M., Bennett C.N., et al. Autocrine regulation of mammary cell differentiation. *Protoplasma* 1990, 159:112-117
28. Stelwagen K., Knight C.H. Effect of unilateral once or twice daily milking of cows on milk yield and udder characteristics in early and late lactation. *The Journal of Dairy Research* 1997, 64:487-494
29. Dewhurst R.J., Knight C.H. Relationship between milk storage characteristics and the short-term response of dairy cows to thrice-daily milking. *Animal Production* 1994, 58:181-187
30. Négroa J.A., Marnet P.G. Cortisol, adrenalin, noradrenalin and oxytocin release and milk yield during first milkings in primiparous ewes. *Small Ruminant Research* 2003, 67:69-75
31. Nudda A., Pulina G., Vallabell R., Bencini R., Enne G. Ultrasound technique for measuring mammary cistern size of dairy ewes. *The Journal of Dairy Research* 2000, 67:101-106
32. Erdman R.A., Varner M. Fixed yield responses to increased milking frequency. *J Dairy Sci* 1995, 78:1199-203.
33. Economides S. The effects of milking cows three times daily on milk yield, milk composition, and profitability compared to two times daily milking. Report. Agricultural Research Institute Ministry of Agriculture, Natural Resources and the Environment 1999, 3-12.
34. Allen D.B., DePeters E.J., Laben R.C. Three times a day milking: effects on milk production, reproductive efficiency, and udder health. *J Dairy Sci* 1986, 69:1441-6.
35. Atashi H. Effect of milking frequency on the lactation performance and lactation curve of Holstein dairy cows in Iran. *Iranian J Appl Anim Sci* 2015, 5:273-8.
36. Wall E.H., McFadden T.B. Use it or lose it: Enhancing milk production efficiency by frequent milking of dairy cows. *J Anim Sci* 2008, 86 Suppl 1:27-36.
37. Sirohi A.S., Pandey H.N., Singla M. Effects of milking frequency on feed intake, body weight and haemato-biochemical changes in crossbred cows. *J App Anim Res* 2012, 40:63-8.
38. Hart K.D., McBride B.W., Duffield T.F., DeVries T.J. Effect of milking frequency on behavior and productivity of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2013, 96:6973-85.
39. Waterman D.F., Harmon R.J., Hemken R.W., Langlois B.E. Milking frequency as related to udder health and milk production. *J Dairy Sci* 1983, 66:253-8.
40. Amos H.E., Kisier T., Loewenstein M. Influence of milking frequency on productive and reproductive efficiencies of dairy cows. *J Dairy Sci* 1985, 68:732-9.
41. Pearson R.E., Fulton L.A., Thompson P.D., Smith J.W. Three times a day milking during the first half of lactation. *J Dairy Sci* 1979, 62:1941-50.
42. Poole D. The effects of milking cows three times daily. *Animal Science* 1982, 34:197-201. doi:10.1017/S0003356100000672
43. Soberon F., Lukas J.L., Van Amburgh M.E., Capuco A.V., Galton D.M., Overton T.R. Effects of increased milking frequency on metabolism and mammary cell proliferation in Holstein dairy cows. *J Dairy Sci* 2010, 93:565-73.34.
44. Roche J.R., Dillon P.G., Stockdale C.R., Baumgard L.H., Van Baale J.M. Relationships among international body condition scoring systems. *J Dairy Sci* 2004, 87:3076-9.35.
45. Bequette B.J., Douglass L.W. The frequency of unilateral milking alters leucine metabolism and amino acid removal by the mammary gland of lactating goats. *J Dairy Sci* 2010, 93, 162-169.
46. Bar-Pelled U., Maltz E., Bruckental I., Robinson B., Voet H., Tagari H. Relationship between frequent milking in early lactation and milk production of high producing dairy cows. *J Dairy Sci* 1995, 78:2726-36.
47. Hillerton J.E., Knight C.H., Turvey A., Wheatley S.D., Wilde C.J. Milk yield and mammary function in dairy cows milked four times daily. *J Dairy Res* 1990, 57:285-94
48. Krnjaić S., Cincović M., Djoković R., Belić B., Ježek J., Starić J. The influence of energy balance, lipolysis and ketogenesis on metabolic adaptation in cows milked twice and three times daily. *Metabolites* 2022, 12(11), 1090.