



## ZNAČAJ METABOLIČKOG PROFILA U PROCENI REPRODUKTIVNIH PERFORMANSI VISOKOMLEČNIH KRAVA

### USE OF METABOLIC PROFILES TO EVALUATE THE REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF HIGH YEALDING DAIRY COWS

**Branko Atanasov<sup>1</sup>, Ljupčo Mickov<sup>1</sup>, Igor Esmerov<sup>1</sup>, Irena Celeska<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Univerzitet „Sv. Ćirilo i Metodije“ u Skoplju, Fakultet veterinarske medicine – Skoplje,  
Lazar Pop-Trajkov 5–7, 1000 Skoplje, Severna Makedonija

#### **Kratak sadržaj**

*Proizvodne performanse visokomlečnih krava na farmama u Severnoj Makedoniji suočavaju se sa velikim izazovima – s jedne strane stoje upravljanje, ishrana i uslovi držanja, a s druge metabolički, zapaljenski i reproduktivni poremećaji. Supkliničke metaboličke bolesti uglavnom prolaze bez jasnih kliničkih znakova, ali predstavljaju osnovu brojnih reproduktivnih problema i imaju značajan indirektan ekonomski uticaj na proizvodnju. U ovom istraživanju prikazani su metabolički parametri kod 120 visokomlečnih krava sa različitih farmi, koje su oko 45. dana nakon teljenja imale slabije reproduktivne rezultate. Sve farme (n=12) imale su slične uslove ishrane i organizacije rada, a analiza je pokazala promene biohemijskih parametara koji su u tesnoj vezi sa reproduktivnim poremećajima. Rezultati su ukazali na umerenu hipoglikemiju, blago povišene vrednosti NEFA i BHBA kod krava sa hipofunkcijom jajnika, niskom stopom koncepcije, odloženim uspostavljanjem ovarijalne aktivnosti i tihim estrusom. Niske koncentracije holesterola u serumu potvrđuju prisustvo negativnog energetskog bilansa, koji se direktno odražava na reprodukciju. Supklinička hipokalcemija i hipofosfatemija uočene su kod krava sa teškim teljenjem, zaostalom posteljicom i usporenom involucijom materice, dok su vrednosti magnezijuma ostale u granicama referentnih vrednosti. Inflamatorni procesi materice poput endometritisa i metritisa, kao i mastitis, bili su praćeni povišenim vrednostima proteinskih biomarkera (gamaglobulini, albumin i ukupni proteini). Povećana aktivnost enzima AST i ALKP ukazivala je na nespecifično opterećenje više organskih sistema u vezi sa telesnom kondicijom, intenzitetom proizvodnje mleka i opterećenjem jetre. Procena biohemijskih parametara može se koristiti kao koristan dijagnostički pokazatelj reproduktivnog statusa visokomlečnih krava, pri čemu i klinički i supklinički metabolički poremećaji imaju presudan uticaj na njihove reproduktivne performanse.*

**Ključne reči:** krave, metabolički profil, reproduktivne performanse, metabolički poremećaji

### Summary

*Production performances of high yielding dairy cows in the farms in North Macedonia have great challenge between management, nutrition and housing from one side and metabolic, inflammatory and reproductive disorders from the other side. Subclinical metabolic disease has silent clinical signalment, but are baseline of many reproductive problems with indirect economic impact of farm production. This study present metabolic results from n=120 high yielding multiparous dairy cows with impaired reproductive performance around 45 days after calving. All farms (n=12) have similar feeding and management system. Metabolic patten exhibit altered biochemical parameters closely related with reproductive disorders. The results have shown moderated hypoglycemia, slightly increased NEFA and BHBA in cows with ovarian hypofunction, low conception rates, prolonged resumption of ovarian activity, and silent estrus. Additionally, low serum cholesterol concentration confirms presence of negative energy balance in reproductive performances. Subclinical hypocalcemia and hypophosphatemia were observed in dystocia, retention of placenta and prolonged uterine involution, despite normomagnesemia. Inflammatory processes of uterus such as endometritis/metritis as well as mastitis presented elevated protein biomarkers: gammaglobulins, albumins, and total proteins. Increased enzyme serum activity of AST and ALKP respond as a result of nonspecific multiorgan metabolic burden between body condition score, milk production and liver overload. Estimation of biochemical parameters can be considering as diagnostic tool for reproductive status of high yielding dairy cows. As a conclusion, both clinical and subclinical metabolic dysfunction have a crucial impact on the reproductive performance in dairy cows.*

**Key words:** cows, metabolic profile, reproductive performance, metabolic disorders

### UVOD

Proizvodne performanse visokomlečnih krava na farmama u Severnoj Makedoniji suočavaju se sa velikim izazovima – s jedne strane stoje upravljanje, ishrana i uslovi držanja, a s druge metabolički, zapaljenski i reproduktivni poremećaji. Termin „metabolički profil“ odnosi se na analizu biohemijskih komponenti krvi koje su korisne za procenu i prevenciju metaboličkih i nutritivnih poremećaja u mlečnim stadima. Danas se ovi krvni metaboliti, kao što su glukoza, neesterifikovane masne kiseline (NEFA),  $\beta$ -hidroksibutirat (BHBA), holesterol, AST i ALT, široko koriste za procenu funkcionalnog stanja jetre, identifikovanje problema u ishrani i identifikaciju nutritivnih uzroka bolesti ili niske proizvodnje. Na primer, povišene koncentracije NEFA u krvi pre teljenja povezane su sa oboljenjima materice i oslabljenom funkcijom neutrofila. Krave sa supkliničkim endometritisom i puerperalnim metritisom imale su značajno više vrednosti NEFA, značajno niži unos suve materije u peripartalnom periodu i značajno više vrednosti BHBA u ranoj laktaciji u poređenju sa kravama sa normalnim zdravstvenim statusom materice. Takođe, visoke koncentracije NEFA bile su snažno povezane sa odloženim

ponovnim uspostavljanjem ovarijalne aktivnosti posle teljenja, što je dovelo do nižih stopa ovulacije, smanjene ovarijalne funkcije i veće učestalosti poremećaja poput hipofunkcije i formiranja cista na jajnicima. Smatra se da povišene koncentracije NEFA utiču na funkciju GH/IGF-1 ose i oslobađanje IGF-1, koji je od ključnog značaja za rast folikula. Zbog toga se procena biohemijskih parametara može smatrati korisnim dijagnostičkim alatom u proceni reproduktivnog statusa visokomlečnih krava. Ovo istraživanje prikazuje naše rezultate merenja metaboličkih parametara kod visokomlečnih krava sa poremećenim reproduktivnim performansama oko 45. dana nakon teljenja.

## **MATERIJAL I METODE**

### **Dizajn studije**

Istraživanje je sprovedeno na dvanaest farmi mlečnih krava i obuhvatilo je ukupno 120 (n=120) multiparih visokomlečnih krava, približno 45 dana nakon teljenja. Sve životinje držane su u ujednačenim uslovima ishrane i gajenja. Farme su odabrane na osnovu prethodnih izveštaja o reproduktivnim poremećajima. Uzorci krvi prikupljeni su tokom rutinskih reproduktivnih pregleda, a za svaku životinju vođena je i pojedinačna anamneza.

### **Uzorkovanje i laboratorijske analize**

Krv je uzimana punkcijom *v. jugularis* u epruvete bez dodatka antikoagulanasa. Uzorci su odmah transportovani u laboratoriju radi određivanja parametara metaboličkog profila. Serum je izdvojen nakon centrifugiranja na 3000 obrtaja u minuti tokom 10 minuta. Biohemijske analize sprovedene upotrebom automatskog spektrofotometra (ChemWell 2910, Awareness Technology Inc., SAD). Prema uputstvima proizvođača (Human, Nemačka) određivani su sledeći parametri: albumini, ukupni proteini, globulini, glukoza, trigliceridi, holesterol, AST, ALT, ALKP, urea, kreatinin, kalcijum, fosfor i magnezijum. Koncentracije NEFA i BHBA određene su korišćenjem komercijalnih setova (Randox, Velika Britanija).

### **Kriterijumi za isključenje**

Krave koje su pokazivale kliničke znake bolesti bile su isključene iz ispitivanja. Uzorci sa neadekvatnim kvalitetom seruma uzorkovani su ponovo.

### **Statistička analiza**

Dobijeni rezultati obrađeni su statističkom analizom osnovnih parametara, uključujući aritmetičku sredinu, standardnu devijaciju, standardnu grešku, koeficijent varijacije, kao i referentne minimalne i maksimalne vrednosti.

## REZULTATI

Rezultati parametara metaboličkog profila su prikazani u Tabeli 1.

**Tabela 1.** Parametri metaboličkog profila kod krava oko 45 dana nakon teljenja.

	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Standardna greška	Koeficijent varijacije	Min	Max
Albumini g/L	31,74	5,45	0,51	22,01	19,23	54,57
Ukupni proteini g/L	67,94	12,10	1,14	18,79	43,95	106,49
Globulini g/L	36,20	12,44	1,18	31,42	15,06	73,35
Glukoza	2,47	1,06	0,10	37,64	0,04	6,67
Holesterol	3,19	1,82	0,17	59,46	0,61	9,67
Trigliceridi	0,44	0,48	0,04	50,44	0,01	2,40
ALKP I/U	155,65	120,20	11,40	82,71	18,20	737,10
ALT I/U	45,46	47,49	4,50	123,57	8,31	435,07
AST I/U	73,13	35,21	3,34	37,70	11,53	195,83
Urea mmol/L	4,28	2,06	0,19	50,33	0,25	12,50
Kreatinin $\mu$ mol/L	131,59	67,57	6,41	35,19	52,47	572,84
NEFA mmol/L	0,50	0,42	0,04	96,06	0,02	2,58
BHBA mmol/L	1,53	1,09	0,10	99,48	0,16	6,56
Kalcijum mmol/L	1,96	0,48	0,04	34,13	0,42	3,35
Fosfor mmol/L	1,63	0,63	0,06	34,52	0,27	3,51
Magnezijum mmol/L	1,16	0,46	0,04	46,18	0,13	2,85

## DISKUSIJA

Metabolička aktivnost tokom perioda zasušenja odvija se bez velikih oscilacija, ali su svi metabolički putevi pripremljeni za nagle promene koje nastupaju nakon teljenja, kada metabolički zahtevi mlečne žlezde nadmašuju potrebe bazalnog metabolizma. Regulacija ovih procesa već dugo je u fokusu istraživanja peripartalnog perioda i pratećih promena u biohemijskim parametrima seruma. Tokom kasne gestacije gravidna materica zauzima gotovo dve trećine trbušne duplje, što dovodi do smanjenja zapremine buraga. Zbog toga se putem hrane često ne mogu obezbediti dovoljne količine glukogenih prekursora za potrebe predstojeće laktacije. Odmah nakon teljenja, papile buraga još uvek nisu sposobne da u potpunosti apsorbuju produkte mikrobne fermentacije. Ovo predstavlja kritičan trenutak za metaboličku homeorezu, jer negativni energetske bilans dovodi do lipolize potkožnog i visceralnog masnog tkiva. Oslobođanje neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA) dovodi do značajnog opterećenja jetra, budući da beta-oksidacija dovodi do nakupljanja acetil-CoA, prekuzora ketonskih tela. Ova faza se stoga prepoznaje kao period visokog rizika za metaboličke poremećaje, često praćene oštećenjem više organskih sistema, naročito jetre i reproduktivnih or-

gana. Mnogi istraživači bavili su se promenama u ovom periodu u nastojanju da ublaže negativne efekte metaboličkih poremećaja.

Kod visokomlečnih krava na farmama u Republici Severnoj Makedoniji često se ne ostvaruje puni genetski potencijal za proizvodnju mleka zbog neadekvatne ishrane i menadžmenta. Rutinski reproduktivni monitoring na ovim farmama ukazuje na prolongiranu pojavu estrusa, smanjenu funkciju jajnika i anovulaciju. Rezultati parametara metaboličkog profila pokazali su normalne koncentracije proteina u serumu, uključujući albumine, ukupne proteine i globulin, što ukazuje da metabolizam proteina nije značajno narušen i da u slučajevima reproduktivnih poremećaja nema izraženog inflamatornog odgovora. Hipoglikemija je, međutim, konzistentan nalaz u postpartalnom periodu usled povećanih energetske potreba. Odgovarajuće povećanje koncentracije NEFA i  $\beta$ -hidroksibutirata (BHBA) odražava energetske deficit, pojačanu lipomobilizaciju i povećanu produkciju ketonskih tela. Iako naši rezultati nisu kumulativno pokazali visoke vrednosti NEFA, uočene su značajno povišene koncentracije na individualnom nivou, povezane sa ovarijalnom disfunkcijom. Glavni problem bila je smanjena funkcija jajnika, odnosno izostanak ponovnog uspostavljanja ciklične aktivnosti. Ovo ukazuje da smanjeni negativni bilans energije povećava mogućnost ostvarivanja reproduktivnih ciljeva.

Blago povišenje triglicerida u serumu ukazuje na očuvanu sposobnost hepatocita da sintetišu lipoproteine veoma male gustine (VLDL) i oslobađaju ih u cirkulaciju. Jetra je, takođe, zadržala sposobnost sinteze holesterola, održavajući prosečne serumske koncentracije u granicama fizioloških vrednosti. Srednje vrednosti enzima AST, ALT i ALKP, ostale su u referentnim granicama, iako je postojala značajna individualna varijabilnost. Ovo potvrđuje centralnu ulogu jetre u očuvanju metaboličke homeostaze kod ispitivanih krava.

Koncentracije uree ukazivale su na stabilnu ravnotežu proteina, što pokazuje da uočeni reproduktivni problemi nisu bili povezani sa poremećajem metabolizma proteina. Vrednosti kreatinina, kao pokazatelja katabolizma mišićnih proteina, nisu ukazivale na gubitak mišićne mase. Procena statusa proteina dodatno je potvrđena vrednostima albumina, ukupnih proteina i globulina. Normoproteinemija, koja je obuhvatala sve proteinske frakcije, uočena je kod većine ispitivanih krava i nije imala direktan uticaj na reproduktivno zdravlje. Izuzetak su bile krave sa inflamatornim procesima endometrijuma i mastitisom, kod kojih su registrovane povišene vrednosti globulina.

Reproduktivni poremećaji su zabeleženi kod krava koje su imale blagu hipokalcemiju u serumu, izazvanu visokim anaboličkim zahtevima za kalcijumom tokom sinteze mleka. Smanjena stabilnost ćelijskih membrana se najverovatnije odrazila na reproduktivni trakt kroz smanjenu kontraktilnost glatke muskulature. Poremećaj ravnoteže kalcijuma usko je povezan sa metabolizmom fosfora, koji je od suštinskog značaja za energetske procese u ćelijama; posledično, hipofosfatemija dodatno narušava fiziološke funkcije reproduktivnih organa. Iako su ove promene u koncentracijama minerala bile blage, značajno su uticale na reproduktivne parametre, kao što je pojava zaostale posteljice, što kasnije drastično smanjuje stepen koncepcije pri prvom osemenjavanju. Krave koje su imale istoriju za-

ostale posteljice, a nisu pokazivale kliničke simptome zapaljenja materice, imale su smanjenu stopu koncepcije na prvom osemenjavanju u poređenju sa kravama kod kojih je izbacivanje posteljice proteklo normalno.

Nalazi ovog istraživanja kod visokomlečnih multiparnih krava naglašavaju značaj održavanja homeostaze u cilju očuvanja reproduktivnog zdravlja.

## ZAKLJUČAK

Promene biohemijskih parametara dovode do ultrastrukturnih promena u hipotalamusu, hipofizi, jajnicima i jetri, što se odražava na biohemijske procese i gensku ekspresiju direktnim i indirektnim putevima. Procena biohemijskih parametara može se stoga koristiti kao dijagnostički alat za procenu reproduktivnog statusa visokomlečnih krava. I klinički i supklinički metabolički poremećaji imaju značajan uticaj na reproduktivne performanse mlečnih krava.

## LITERATURA

1. Aungier SP, Roche JF, Diskin MG, Crowe MA, 2014, Risk factors that affect reproductive target achievement in fertile dairy cows, *J Dairy Sci*, 97, 3472-3487.
2. Grummer RR, 1993, Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows, *J Dairy Sci*, 76, 3882-3896.
3. Hammon DS, Evjen IM, Dhiman TR, Goff JP, Walters JL, 2006, Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders, *Vet Immunol Immunopathol*, 113, 21-29.
4. Huzzey JM, Veira DM, Weary DM, von Keyserlingk MAG, 2007, Prepartum behavior and dry matter intake identify dairy cows at risk for metritis. *J Dairy Sci* 90:3220-3233 ().
5. Puppel K, Kuczynska B, 2016, Metabolic profiles of cow's blood; a review, *J Sci Food Agric*, 96, 4321-4328
6. LeBlanc SJ, Lissemore KD, Kelton DF, Duffield TF, Leslie KE, 2006, Major advances in disease prevention in dairy cattle, *J Dairy Sci*, 89, 1267-1279.
7. Rossato W, González FHD, Dias MM, Riccò D, Valle SF, Rosa VLL, 2001, Number of lactations affects metabolic profile of dairy cows, *Arch Vet Sci*, 6, 83-88.
8. Sakowski T, Kuczynska B, Puppel K, Metera E, Słoniewski K and Barszczewski J, 2012, Relationships between physiological indicators in blood and yield as well as chemical composition of milk obtained from organic dairy cows, *J Sci Food Agric*, 92, 2905-2912.