



Uticaj frekvencije muže na povezanost mobilizacije lipida i pokazatelja funkcionalnog statusa jetre kod krava u laktaciji

Srđan Krnjaić^a, Radojica Đoković^a, Mira Majkić^a, Jože Starič^b, Marko Cincović^a

^aUniverzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Srbija

^bUniverzitet u Ljubljani, Veterinarski fakultet, Slovenija

*Autor za kontakt: mcincovic@gmail.com

SAŽETAK

Kravlje mleko je nezamenjiv hranjivi proizvod i sa porastom svetske populacije neophodno je bilo povećati broj krava i njihovu produktivnost. Povećana proizvodnja mleka je zahtevala je genetsku selekciju krava na mlečnost, a sa tehnološkog aspekta bilo je potrebno da se poveća učestalost muže. Povećanje učestalosti muže mlečnih goveda na više od dve muže dnevno (što je uobičajeno) rezultiralo je povećanjem proizvodnje mleka. Prilikom porasta proizvodnje mleka dolazi do homeoreze koja se karakteriše povećanim trošenjem sopstvenih masnih rezervi i mobilizacije lipida sa posledičnim povećanim opterećenjem hepatocita. Obzirom da povećanje frekvencije muže dovodi do porasta proizvodnje mleka, cilj ovog rada je da se ispita veza između koncentracije NEFA kao pokazatelja lipolize sa parametrima funkcionalnog statusa hepatocita kod krava u dvokratnoj i trokratnoj muži. U ogled je uključeno 180 krava Holštajn-frizijske rase, tako da je 90 bilo u dvokratnoj muži, a 90 u trokratnoj muži. Krv je uzorkovana iz *v.coccigea*, neposredno posle jutarnje muže. Za sakupljanje krvi korišćeni su vakutajneri sa clot aktivatorom za odvajanje seruma. Određeni su sledeći biohemijski parametri u krvi: neesterifikovane masne kiseline (NEFA), glukoza (GLU), holesterol (CHOL), trigliceridi (TGC), ukupni bilirubin (TBIL), aspartat-aminotransferaza (AST), gama-glutamilttransferaza (GGT), ukupni proteini (TPROT), albumin (ALB) i urea. Jačina veze NEFA sa ispitivanim parametrima krvi, određena je pomoću Pirsonovog koeficijenta korelacije posebno kod krava u dvokratnoj muži i trokratnoj muži. Predstavljene su regresione jednačine i grafikoni linearne regresije i korelacije. Poređenjem koeficijenata korelacije pomoću Fisherove z-transformacije ispitano je da li postoji razlika u jačini korelacije između ispitivanih parametara u dvokratnoj i trokratnoj muži. Koeficijenti korelacije između NEFA i ispitivanih parametara u trokratnoj u odnosu na dvokratnu mužu bili su: CHOL (0,54: 0,13; $p < 0,001$), TGC (0,54: 0,10; $p < 0,001$), TBIL (0,82: 0,15; $p < 0,0001$), AST (0,82: 0,14 ; $p < 0,0001$), GGT (0,82: 0,14 ; $p < 0,0001$), TPROT (0,48: 0,08 ; $p < 0,01$), ALB (0,60: 0,21 ; $p < 0,001$) i UREA (0,49: 0,046; $p < 0,05$). Za sve ispitivane parametre nađeno je da postoji mnogo jača korelacija sa NEFA kod krava u trokratnoj muži u odnosu na dvokratnu. Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da povećane frekvencije sa dve na tri muže dnevno dovodi porasta zavisnosti funkcionalnog statusa hepatocita od intenziteta lipolize. Sa porastom lipolize (porast NEFA) dolazi do opadanja sekretorne sposobnosti hepatocita (opada vrednost holesterola, triglicerida i albumina), a raste opterećenje hepatocita (zbog porasta aktivnost AST i GGT) i biliarnih puteva (porast TBIL). Povećanje frekvencije muže zahteva veoma pažljivu procenu metaboličkog statusa krava kroz izradu metaboličkog profila.

Ključne reči:

dvokratna muža, trokratna muža, funkcionalni status jetre, lipomobilizacija.

Uvod

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 (Lessire et al., 2020; Khaskheli, 2020; Larsen et al., 2021).

Povećanje učestalosti muže mlečnih goveda na više od dve muže dnevno rezultiralo je povećanjem proizvodnje mleka (Allen et al., 1986; Knight et al., 1993; Erdman and Varner, 1995; Stelwagen and Knight, 1997; Klei et al., 1997; Stelwagen 2001). 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 stimuliše sekreciju laktogenih hormona koji dalje omogućavaju bolju perzistenciju laktacije, jer pomenuti hormoni povećavaju broj sekretornih ćelija i samim tim zapreminu izlučenog mleka. Involucija vimena uz apoptozu ćelija se biološki dešava 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.

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 (Erdman and Varner, 1995; Economides, 1999; Wall and McFadden, 2008; Sirohi et al., 2012; Hart et al., 2013; Atashi, 2015). 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 do 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 jednom ogledu zavisilo je od povećanja prinosa mleka posle aplikacije trokratne muže na jedinke koje se muzu 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 koje prati povećane prinose mleka i njegovih ingredijenata može da bude ispraćeno adekvatnim unosom hrane ili se povećavaju homeoretski mehanizmi.

Jedan od najočiglednijih efekata kao rezultat povećane učestalosti muže je mobilizacija telesnih rezervi (Hillerton et al., 1990; Bar-Pelled et al., 1995; Roche et al., 2004; Soberon et al., 2010; Morales-Piñeyrua et al., 2022). 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 ogledima 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 prestrojavanja. 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 ogledu u kom je merena koncentracija hormona radilo se o šestokratnoj muži dnevno) dovodi do tipičnog endokrinološkog prestrojavanja 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 energetskog unosa poreklom iz hrane.

Prilikom porasta proizvodnje mleka dolazi do homeoreze koja se karakteriše povećanim trošenjem sopstvenih masnih rezervi i mobilizacije lipida sa posledičnim povećanim opterećenjem hepatocita. Obzirom da povećanje frekvencije muže dovodi do porasta proizvodnje mleka, cilj ovog rada je da se ispita veza između koncentracije NEFA kao pokazatelja lipolize sa parametrima funkcionalnog statusa hepatocita kod krava u dvokratnoj i trokratnoj muži.

Materijal i metod rada

U ogled je uključeno 180 krava Holštajn-frizijske rase, tako da je 90 bilo u dvokratnoj muži, a 90 u trokratnoj muži. U svakoj grupi krave su klasifikovane na one u ranoj laktaciji, piku laktacije i stabilnoj laktaciji, gde je bilo po 30 krava. U ogled su uključene zdrave krave, koje nisu imale kliničke niti predhodno detektovane subkliničke zdravstvene probleme. Krave su hranjene potpuno umešanim (TMR) obrokom u skladu sa dinamikom muže. Obrok je sastavljen prema NRC standardima i omogućuje adekvatne količine energije i drugih ingredijenata shodno proizvodnji mleka i periodu laktacije. Unošenje hrane i dizanje hrane u cilju što boljeg konzumiranja je vršeno od strane radnika više puta tokom dana. Voda je bila dostupna ad libitum. Muža je vršena u standardnim automatskim izmuzištima.

Krv je uzorkovana iz *v.coccigea*, neposredno posle jutarnje muže. Za sakupljanje krvi korišćeni su vakutajneri sa clot aktivatorom za odvajanje seruma (Bexton, Dickinson and Company, USA). Epruvete su stavljane u priručni frižider, a spontano odvojeni serum je analiziran na biohemijske i endokrinološke parametre istog dana posle uzorkovanja. Određeni su sledeći biohemijski parametri u krvi: neesterifikovane masne kiseline (NEFA), glukoza (GLU), holesterol (CHOL), trigliceridi (TGC), ukupni bilirubin (TBIL), aspartat-aminotransferaza (AST), gama-glutamilttransferaza (GGT), ukupni proteini (TPROT), albumin (ALB) i urea. Korišćeni su standardni kitovi proizvođača Randox (UK) i BioSystem (Spain) i spektrofotometar Rayto Chemray 120 (China).

Jačina veze NEFA sa ispitivanim parametrima krvi, određena je pomoću Pirsonovog koeficijenta korelacije posebno kod krava u dvokratnoj muži i trokratnoj muži. Predstavljene su regresione jednačine i grafikoni linearne regresije i korelacije. Poređenjem koeficijenata korelacije pomoću Fišerove z-transformacije ispitano je da li postoji razlika u jačini korelacije između ispitivanih parametara u dvokratnoj i trokratnoj muži.

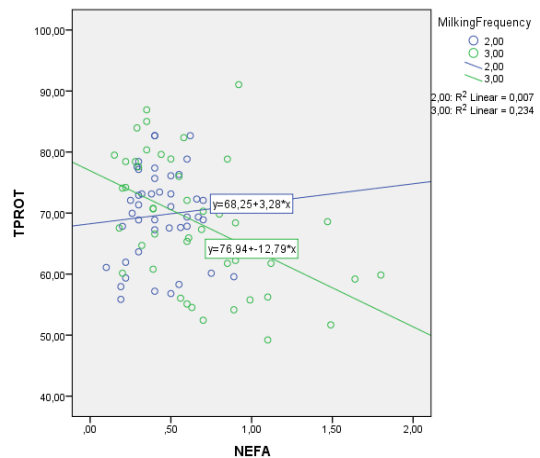
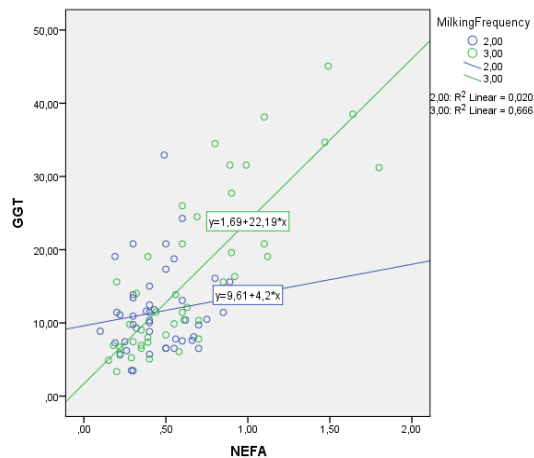
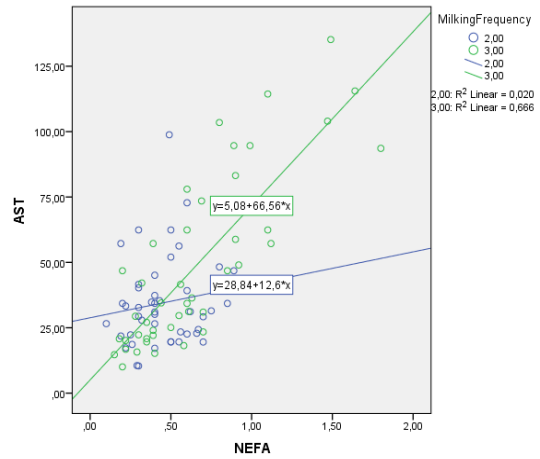
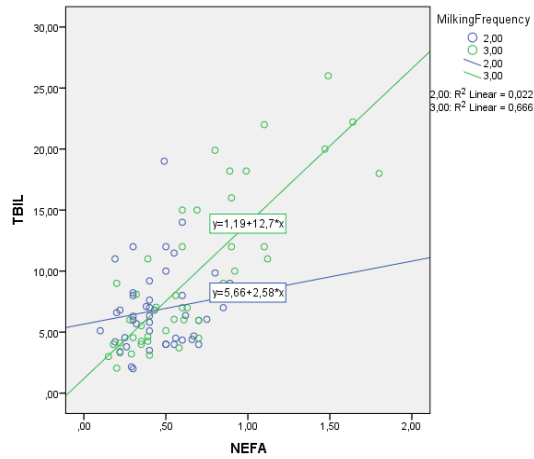
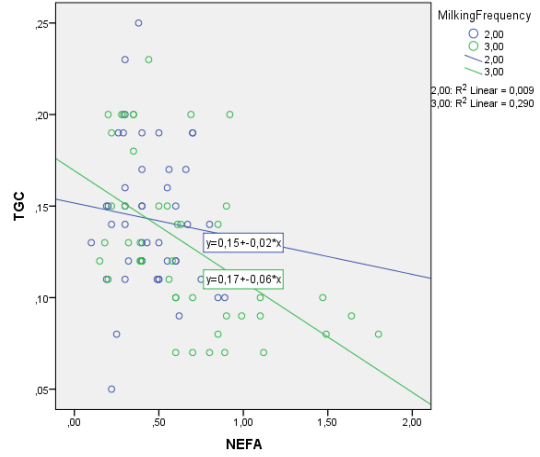
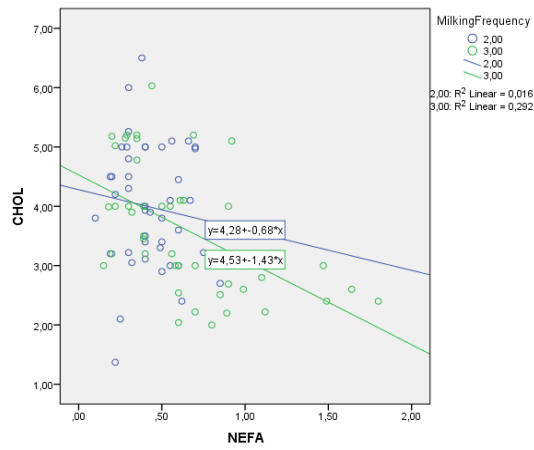
Rezultati

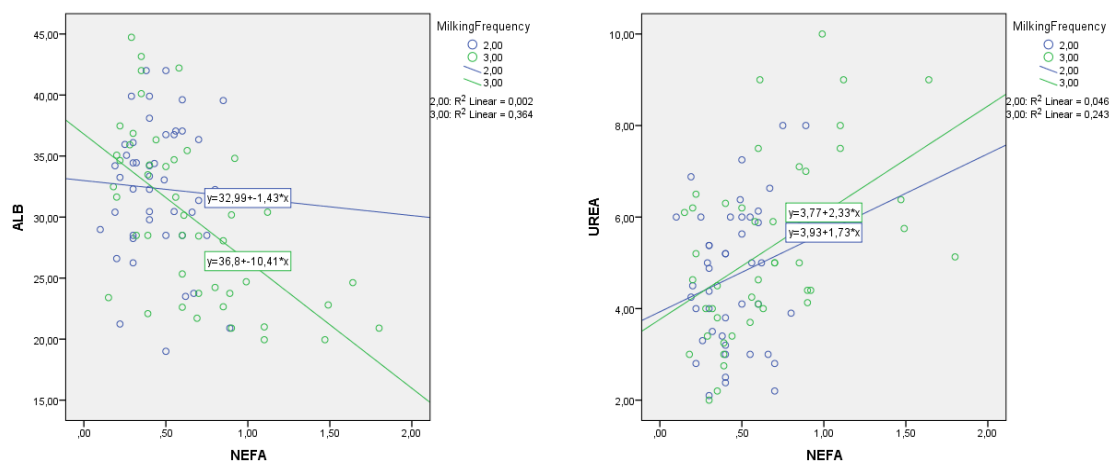
Najveći broj ispitivanih metaboličkih parametara pokazuje mnogo veću povezanost sa NEFA u trokratnoj muži u odnosu na dvokratnu. To znači da su vrednosti i varijabilnost ispitivanih parametara mnogo više determinisani vrednostima NEFA (viša vrednost koeficijenta determinacije r^2) kod krava u trokratnoj u odnosu na dvokratnu mužu. Koeficijenti korelacije između NEFA i ispitivanih parametara u trokratnoj u odnosu na dvokratnu mužu bili su: CHOL (0,54: 0,13; $p < 0,001$), TGC (0,54: 0,10; $p < 0,001$), TBIL (0,82: 0,15; $p < 0,0001$), AST (0,82: 0,14; $p < 0,0001$), GGT (0,82: 0,14; $p < 0,0001$), TPROT (0,48: 0,08; $p < 0,01$), ALB (0,60: 0,21; $p < 0,001$) i UREA (0,49: 0,046; $p < 0,05$). Za sve ispitivane parametre nađeno je da postoji mnogo jača korelacija sa NEFA kod krava u trokratnoj muži u odnosu na dvokratnu. Rezultati su prikazani u Tabeli 1 i na Grafikonu 1.

Tabela 1. Linearna povezanost lipidne mobilizacije sa parametrima funkcionalnog statusa hepatocita kod krava u dvokratnoj i trokratnoj muži

Table 1. Linear association of lipid mobilization with parameters of liver functional status in cows in two and three time milking

Zavisna varijabla (x)	Regresiona formula u dvokratnoj muži	r^2/r	Regresiona formula u trokratnoj muži	r^2/r	Poređenje korelacionog parametra r
CHOL	=4,28-0,68xNEFA	0,016/ 0,126	=4,53-1,43xNEFA	0,292/0,540	<0,001
TGC	=0,15-0,02xNEFA	0,009/ 0,095	=0,17-0,06xNEFA	0,290/0,539	<0,001
TBIL	=5,66+2,58xNEFA	0,022/ 0,148	=1,19+12,7xNEFA	0,666/0,816	<0,0001
AST	=28,84+12,6xNEFA	0,020/ 0,141	=5,08+66,56xNEFA	0,666/0,816	<0,0001
GGT	=9,61+4,2xNEFA	0,020/ 0,141	=1,69+22,19xNEFA	0,666/0,816	<0,0001
TPROT	=68,25+3,28xNEFA	0,007/0,084	=76,94-12,79xNEFA	0,234/0,484	<0,01
ALB	=33,991,43xNEFA	0,002/0,045	=36,8-10,41xNEFA	0,364/0,603	<0,0001
UREA	=3,93+1,73xNEFA	0,046/0,214	=3,77+2,33xNEFA	0,243/0,493	<0,05





Grafikon 1. Korelacija i regresija između NEFA i parametara funkcionalnog statusa jetre kod krava u dvokratnoj i trokratnoj muži

Figure 1. Correlation and regression between NEFA and parameters of liver functional status in cows in two and three time milking

Diskusija

Savremena proizvodnja mleka na farmama krava uključuje visokoselekcionisane krave za ove namene, pa je genski i tehnološki pritisak za postizanjem veće proizvodnje moguć uzrok različitih metaboličkih izmena kod krava, koji u uslovima negativnog energetskeg bilansa ili bilo kakvog disbalansa u okruženju ili tehnologiji može dovesti i do subkliničkih i kliničkih metaboličkih i drugih pridruženih oboljenja. Kako su metabolička adaptacija kod krava u laktaciji najvažniji uzrok i posledica visoke proizvodnje mleka, a paralelno sa tim metaboličke bolesti su najvažniji uzrok izmenjene produktivnosti krava, potrebno je da se poznaju fiziološke koncentracije i opsezi metabolita koji su u osnovi procene metaboličkog profila krava (Pires et al., 2022; Radostits et al., 2007; Reist et al., 2002). Kako je u ovom radu period laktacije bio veoma značajan, kako u okviru same hipoteze, tako i prilikom potvrde hipoteze kroz rezultate, prodiskutovaćemo glavne metaboličke parametre u funkciji perioda laktacije, posebno u funkciji prelaska iz stanja zasušenosti u stanje laktacije. Ovaj prelaz je posebno značajan, jer ukazuje na šta se zapravo dešava u organizmu krava kada se dodatno poveća frekvencija muže i samim tim proizvodnja mleka. Taj period prelaska predstavlja dobar model za razumevanje uticaja povećane proizvodnje mleka na metaboličku adaptaciju krava i eventualni razvoj metaboličkih bolesti.

Negativni energetskeg bilans kod krava rezultira brzim razvojem lipolize uz porast koncentracije NEFA u krvi (Civelek et al., 2011; Gonzalez et al., 2011; Djoković et al., 2015, Djokić et al., 2019). Koncentracija NEFA je viša u ranoj laktaciji u odnosu na period kasnije i stabilne laktacije, dok u samom piku laktacije vrednosti NEFA mogu varirati u zavisnosti od toga kako krava toleriše metaboličko opterećenje koje nosi visoka proizvodnja mleka. Više vrednosti NEFA u ranoj laktaciji su postojale i u našim rezultatima, a to povećanje je bilo izraženije kod krava u trokratnoj muži. Povećana lipoliza sa dolaskom NEFA u jetru, povećava njihovo metaboličko iskorišćavanje kada raste ketogeneza i koncentracija BHB. BHB je značajan indikator negativnog energetskeg bilansa i sklonosti ka dekompenzaciji negativnog energetskeg bilansa kada može nastati subklinička ili klinička ketoza. U našem ogledu koncentracije kod pojedinih krava ukazuju da postoji razvijen uslov za nastanak ovog metaboličkog poremećaja (Brunner et al., 2019; Benedet et al., 2019; Oetzel, 2004; Duffield, 2000), jer je BHB u serumu bila iznad 1,2 mmol/L što je prag subkliničke ketoze, dok krave sa visokim vrednostima BHB preko 2,9 mmol/L kod kojih postoji osnova za kliničku ketozu nije ni bilo po uslovu ogleda. Lipoliza i ketogeneza pokazuju povezanost sa proizvodnjom mleka i energijom koja je potrebna za laktaciju, a NEFA i BHB zajedno mogu pokazati sklonost krava ka nastanku masne infiltracije hepatocita, odnosno masne degeneracije i masne jetre, koja nastaje kod izraženog negativnog energetskeg bilansa, visoke proizvodnje i homeoreze u ranoj laktaciji (Jorritsma et al., 2001; Drackley et al., 2005; Gross et al., 2011; Ospina et al., 2010).

Smatra se da gotovo ½ krava u ranoj laktaciji ima određeni stepen masne infiltracije jetre, a od toga do jedne trećine krava razvije jak intenzitet masne jetre, koji dalje dovode do kliničko-biohemijskih promena u metaboličkom profilu. Masna infiltracija jetre izaziva lezije u tkivu jetre i opšte povećanje nivoa enzima koji ukazuje na povredu hepatocita, odnosno AST, GGT i GLDH. Kao posledica opterećenja hepatocita u ranoj laktaciji dolazi do razvoja tzv. sindroma bilijarne retencije i

sinroma nekroze hepatocita, kada se menja koncentracija bilirubina i jetrih enzima u krvi. Promene koje smo dobili su u skladu sa ranije dobijenim rezultatima (Sevinc et al., 2002; Vernon 2005; Hussein et al., 2008; Du et al., 2017; Liu et al. 2012; Mohsin et al., 2022). Vrednost bilirubinemije je od 3,4 do 6,6 $\mu\text{mol/l}$, mada su nove referentne vrednosti, kao i referentne vrednosti u našem regiju nešto šireg opsega u rasponu od 1,5 do 8,5 $\mu\text{mol/l}$. Smatra se da kod zdravih krava ta vrednost može biti i do 13 $\mu\text{mol/l}$, s tim što pri koncentracijama višim od 8,5 postoji početna infiltracija hepatocita mastima (kod difuzne lipidoze ta vrednost je oko 12), pa je ova vrednost ustanovljena kao gornja referentna vrednosti, a često kod kliničke ketoze upravo postoji vrednost bilirubina preko 8,5. Povećana aktivnost enzima jetre u ranoj laktaciji posledica je svih ovih metaboličkih promena u jetri i nastaje kao posledica degeneracije hepatocita. Tada raste aktivnost enzima kao što su GGT, AST, LDH, ALT i ALP. Oni nisu klinički podjednako značajni i mnogi nisu organ-specifični enzimi. Tako na primer kod drugotrajnog ležanja krava doći će do porasta aktivnosti AST. Mnogi enzimi će biti povišeni i kod dislokacija organa, infestacije parazitima, kao posledica delovanja različitih lekova itd. Kako je kod krava u trokratnoj muži tokom našeg oglada utvrđeno da je promena vrednosti metaboličkih parametara u većoj meri zavisna od lipolize i ketogeneze, potrebno je da se kod krava u trokratnoj muži značajno češće kontroliše nivo NEFA i BHB, kako njihov porast koji može pratiti povećanu produktivnost krava nebi postao nekontrolisan, čime bi ugrozio metaboličku homeostazu, a naknadno bi mogao dovesti i do većeg opadanja produktivnosti kod krava.

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da povećane frekvencije sa dve na tri muže dnevno dovodi do porasta zavisnosti funkcionalnog statusa hepatocita od intenziteta lipolize. Sa porastom lipolize (porast NEFA) dolazi do opadanja sekretorne sposobnosti hepatocita (opada vrednost holesterola, triglicerida i albumina), a raste opterećenje hepatocita (zbog porasta aktivnosti AST i GGT) i biliarnih puteva (porast TBIL). Povećanje frekvencije muže zahteva veoma pažljivu procenu metaboličkog statusa krava kroz izradu metaboličkog profila.

Literatura

- Allen, D.B., DePeters, E.J., Laben, R.C. 1986. Three times a day milking: Effects on milk production, reproductive efficiency and udder health. *Journal of Dairy Science* 69:1441-1446.
- Atashi, H. 2015. Effect of milking frequency on the lactation performance and lactation curve of Holstein dairy cows in Iran. *Iranian J Appl Anim Sci* 5:273-8.
- Bar-Pelled, U., Maltz, E., Bruckental, I., Robinson, B., Voet, H., Tagari, H. 1995. Relationship between frequent milking in early lactation and milk production of high producing dairy cows. *J Dairy Sci* 78:2726-36.
- Benedet, A., Manuelian, C.L., Zidi, A., Penasa, M., De Marchi, M. 2019. Invited review: β -hydroxybutyrate concentration in blood and milk and its associations with cow performance. *Animal* 13: 1676–1689.
- Brunner, N., Groeger, S., Raposo, J.C., Bruckmaier, R.M., Gross, J.J. 2019. Prevalence of subclinical ketosis and production diseases in dairy cows in Central and South America, Africa, Asia, Australia, New Zealand, and Eastern Europe. *Trans. Anim. Sci* 3: 19–27.
- Civelek, T., Aydin, I., Cingi, C.C., Yilmaz, O., Kabu, M. 2011. Serum non-esterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate in dairy cows with retained placenta. *Pak. Vet. J.* 31, 341–344.
- Djokovic, R., Cincovic, M., Belic, B., Toholj, B., Davidov, I., Hristovska, T. 2015. Relationship between blood metabolic hormones, metabolites and energy balance in Simmental dairy cows during peripartum period and lactation. *Pak. Vet. J.* 35: 163–167.
- Djoković, R., Cincović, M., Ilić, Z., Kurćubić, V., Andjelić, B., Petrović, M., Lalić, N., Jašović, B. 2019. Relationships between contents of biochemical metabolites in blood and milk in dairy cows during transition and mid lactation. *Int. J. Appl. Res. Vet. Med.* 17, 1–9.
- Drackley, J.K., Dann, H.M., Douglas, G.N., Janovick-Gurtzky, N.A., Lutherland, N.B., Underwood, J.P., Loor, J. 2005. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Ital. J. Anim. Sci.* 4: 323–344.
- Du, X., Chen, L., Huang, D., Peng, Z., Zhao, C., Zhang, Y., et al. 2017. Elevated apoptosis in the liver of dairy cows with ketosis. *Cellular Physiology and Biochemistry* 43(2): 568-578.
- Duffield, T. 2000. Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* 16, 231–253.
- Economides S. 1999. 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. 3-12.
- Erdman, R.A., Varner, M. 1995. Fixed yield responses to increased milking frequency. *J Dairy Sci* 78:1199-203.
- Gonzalez, F.D., Murino, R., Pereira, V., Campos, R., Benedito, J.L. 2011. Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in high yielding dairy cows. *J. Vet. Sci.* 12: 251–255.

- Gross, J., Van Dorland, H.A., Bruckmaier, R.M., Schwar, F.J. 2011. Performance and metabolic profile of dairy cows during a lactation and deliberately induced negative energy balance with subsequent realimentation. *J. Dairy Sci.* 94: 1820–1830.
- Hart, K.D., McBride, B.W., Duffield, T.F., DeVries, T.J. 2013. Effect of milking frequency on behavior and productivity of lactating dairy cows. *J Dairy Sci.*96:6973-85.
- Hillerton, J.E., Knight, C.H., Turvey, A., Wheatley, S.D., Wilde, C.J. 1990. Milk yield and mammary function in dairy cows milked four times daily. *J Dairy Res.* 57:285-94
- Hussein, H., Abd Ellah, M.R. 2008. Effects of dystocia, fetotomy and caesarian sections on the liver enzymes activities and concentrations of some serum biochemical parameters in dairy cattle. *Animal reproduction science*, 105(3-4): 384-391.
- Jorritsma, R., Jorritsma, H., Schukken, Y.H., Bartlett, P.C., Wensing, T.H., Wentink, G.H. 2001. Prevalence and indicators of post partum fatty infiltration of the liver in nine commercial dairy herds in The Netherlands. *Livestock Production Science* 68(1): 53-60.
- Khaskheli, A.A. 2020. Influence of dietary manipulations and milking frequency on production of dairy cows. *Online Journal of Animal and Feed Research* 10(4): 180-184.
- Klei, L.R., Lynch, J.M., Barbano, D.M., Oltenacu, P.A., Lednor, A.J., Bandler, D.K. 1997. Influence of milking three times a day on milk quality. *Journal of Dairy Science* 80:427-436
- Knight, C.H., Wilde, C.J. 1993. Mammary cell changes during pregnancy and lactation. *Livestock Production Science* 35:3-19
- Larsen, M., Franchi, G.A., Herskin, M.S., Foldager, L., Larsen, M.L., Hernández-Castellano, et al. 2021. Effects of feeding level, milking frequency, and single injection of cabergoline on feed intake, milk yield, milk leakage, and clinical udder characteristics during dry-off in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 104(10): 11108-11125.
- Lessire, F., Moula, N., Hornick, J.L., Dufresne, I. 2020. Systematic review and meta-analysis: Identification of factors influencing milking frequency of cows in automatic milking systems combined with grazing. *Animals*, 10(5): 913.
- Liu, P., He, B. X., Yang, X. L., Hou, X. L., Han, J. B., Han, Y. H., et al. 2012. Bioactivity evaluation of certain hepatic enzymes in blood plasma and milk of Holstein cows. *Pak Vet J*, 32: 601-4.
- Mohsin, M. A., Yu, H., He, R., Wang, P., Gan, L., Du, Y.. 2022. Differentiation of subclinical ketosis and liver function test indices in adipose tissues associated with hyperketonemia in postpartum dairy cattle. *Frontiers in Veterinary Science* 8: 796494.
- Morales-Piñeyrua, J.T., Damián, J.P., Banchemo, G., Blache, D., Sant'Anna, A.C. 2022. Metabolic profile and productivity of dairy Holstein cows milked by a pasture-based automatic milking system during early lactation: Effects of cow temperament and parity. *Research in Veterinary Science* 147: 50-59.
- Oetzel, G.R. 2004. Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.*, 20, 651–674.
- Ospina, P.A., Nydam, D.V., Stokol, T., Overton, T.R. 2010. Associations of elevated nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. *J. Dairy Sci* 93: 1596–1603.
- Pires, J.A.A., Larsen, T., Leroux, C. 2022. Milk metabolites and fatty acids as noninvasive biomarkers of metabolic status and energy balance in early-lactation cows. *J. Dairy Sci* 105: 201–220.
- Radostits O.M., Blood, D.C., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W. 2007. *Veterinary Medicine, A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*, 9th ed.; W.B. Saunders Company Ltd.: London, UK; New York, NY, USA; Philadelphia, PA, USA; San Francisco, CA, USA; St. Louis, MO, USA; Sydney, Australia.
- Reist, M., Erdin, D., Von Euw, D., Tschuemperlin, K., Leunberger, H., Chilliard, Y., et al. 2002. Estimation of energy balance at the individual and herd level using blood and milk traits in high-yielding dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85: 3314–3327.
- Roche, J.R., Dillon, P.G., Stockdale, C.R., Baumgard, L.H., Van Baale, J.M. 2004. Relationships among international body condition scoring systems. *J Dairy Sci.* 87:3076-9.35.
- Sevinc, M., Ok, M., Basoglu, A. 2002. Liver function in dairy cows with abomasal displacement. *Revue de médecine vétérinaire* 153(7): 477-480.
- Sirohi, A.S., Pandey, H.N., Singla, M. 2012. Effects of milking frequency on feed intake, body weight and haemato-biochemical changes in crossbred cows. *J App Anim Res.* 40:63-8.
- Soberon, F., Lukas, J.L., Van Amburgh, M.E., Capuco, A.V., Galton, D.M., Overton T.R. 2010. Effects of increased milking frequency on metabolism and mammary cell proliferation in Holstein dairy cows. *J Dairy Sci.* 93:565-73.34.
- Stelwagen, K., Knight, C.H. 1997. 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* 64:487-494
- Stelwagen K. 2001. Effect of milking frequency on mammary functioning and shape of the lactation curve. *Journal of Dairy Science* 84:E204-E211
- Vernon, R.G. 2005. Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. *Journal of Dairy Research*, 72(4): 460-469.
- Wall, E.H., McFadden, T.B. 2008. Use it or lose it: Enhancing milk production efficiency by frequent milking of dairy cows. *J Anim Sci.* 86 Suppl 1:27-36.

The effect of milking frequency on the association between lipid mobilization and indicators of liver functional status in lactating cows

Srđan Krnjaić^a, Radojica Đoković^a, Mira Majkić^a, Jože Starič^b, Marko Cincović^a

^aUniversity of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department of veterinary medicine, Novi Sad, Serbia

^bUniversity of Ljubljana, Veterinary faculty, Ljubljana, Slovenia

*Corresponding author: mcincovic@gmail.com

ABSTRACT

Cow's milk is an irreplaceable nutritional product, and with the growth of the world's population, it was necessary to increase the number of cows and their productivity. Increased milk production required the genetic selection of cows for milk yield, and from the technological aspect, it was necessary to increase the frequency of milking. Increasing the milking frequency of dairy cattle to more than two milkings per day (which is common) resulted in increased milk production. During the increase in milk production, homeostasis occurs, which is characterized by increased consumption of own fat reserves and mobilization of lipids with a consequent increased load on hepatocytes. Considering that increasing the frequency of milking leads to an increase in milk production, the aim of this work is to examine the relationship between the concentration of NEFA as an indicator of lipolysis and the parameters of the functional status of hepatocytes in cows in double and triple milking. 180 Holstein-Friesian cows were included in the experiment, so 90 were in double milking and 90 in triple milking. Blood was sampled from the v. coccyge, immediately after the morning milking. For blood collection, vacutainers with clot activator were used to separate the serum. The following biochemical parameters were determined in the blood: non-esterified fatty acids (NEFA), glucose (GLU), cholesterol (CHOL), triglycerides (TGC), total bilirubin (TBIL), aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyltransferase (GGT), total protein (TPROT), albumin (ALB) and urea. The strength of the connection between NEFA and the investigated blood parameters was determined using the Pearson correlation coefficient, especially in cows in double milking and triple milking. Regression equations and graphs of linear regression and correlation are presented. By comparing the correlation coefficients using Fisher's z-transformation, it was examined whether there is a difference in the strength of the correlation between the investigated parameters in double and triple milk. The correlation coefficients between NEFA and the examined parameters in three-time versus two-time milking were: CHOL (0.54: 0.13; $p < 0.001$), TGC (0.54: 0.10; $p < 0.001$), TBIL (0.82: 0.15; $p < 0.0001$), AST (0.82: 0.14; $p < 0.0001$), GGT (0.82: 0.14; $p < 0.0001$), TPROT (0.48: 0.08; $p < 0.01$), ALB (0.60: 0.21; $p < 0.001$) and UREA (0.49: 0.046; $p < 0.05$). For all investigated parameters, it was found that there is a much stronger correlation with NEFA in cows in three time milking compared to two time milking. Based on the obtained results, we can conclude that the increased frequency from two to three milkings per day leads to an increase in the dependence of the functional status of hepatocytes on the intensity of lipolysis. With the increase in lipolysis (increase in NEFA), the secretory capacity of hepatocytes decreases (the value of cholesterol, triglycerides and albumin decreases), and the load on hepatocytes increases (due to the increase in AST and GGT activity) and biliary tracts (increase in TBIL). Increasing the frequency of milking requires a very careful assessment of the metabolic status of cows through the creation of a metabolic profile.

KEY WORDS

Two time milking, three time milking, liver functionally status, lipid mobilization.