UNIVERZA V LJUBLJANI

VETERINARSKA FAKULTETA

JOŽE STARIČ

DINAMIKA BIOKEMIJSKIH KAZALCEV METABOLIZMA KOSTI KRAV MOLZNIC, TRETIRANIH Z VISOKIM ODMERKOM VITAMINA D_3, KOT PREVENTIVA OBPORODNE HIPOKALCEMIJE

DOKTORSKA DISERTACIJA

LJUBLJANA, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI

VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 636.2.09:612.751:616-008:618.6(043.3)

mag. JOŽE STARIČ, dr. vet. med.

DINAMIKA BIOKEMIJSKIH KAZALCEV METABOLIZMA KOSTI KRAV MOLZNIC, TRETIRANIH Z VISOKIM ODMERKOM VITAMINA D_3, KOT PREVENTIVA OBPORODNE HIPOKALCEMIJE

DYNAMICS OF BIOCHEMICAL MARKERS OF BONE METABOLISM IN DAIRY COWS TREATED WITH HIGH DOSE OF VITAMIN D_3 AS PREVENTION AGAINST PERIPARTURIENT HYPOCALCEMIA

DOKTORSKA DISERTACIJA

PhD THESIS

LJUBLJANA, 2010

Jože Starič

DINAMIKA BIOKEMIJSKIH KAZALCEV METABOLIZMA KOSTI KRAV MOLZNIC, TRETIRANIH Z VISOKIM ODMERKOM VITAMINA D_3, KOT PREVENTIVA OBPORODNE HIPOKALCEMIJE

Delo je bilo opravljeno na Kliniki za prežvekovalce z ambulantno kliniko Veterinarske fakultete v Ljubljani.

Predstojnica Klinike za prežvekovalce z ambulantno kliniko: prof. dr. Martina Klinkon, dr. vet. med.

Javni zagovor je bil opravljen:

Mentor: prof. dr. Tomaž Zadnik, dr. vet. med.

Komisija za oceno in zagovor:

predsednik: prof. dr. Milan Pogačnik, dr. vet. med.

članica: prof. dr. Martina Klinkon, dr. vet. med.

član: prof. dr. Zvonko Stojević, dr. vet. med.

Izjavljam, da je predložena disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Jože Starič

VSEBINA

SEZNAM OKRAJŠAV 7
SEZNAM TABEL 10
SEZNAM GRAFIKONOV 12
SEZNAM FOTOGRAFIJ IN SHEM 13
SEZNAM SHEM 13
IZVLEČEK 14
ABSTRACT 15
1. **UVOD** 16
2. **PODATKI IZ LITERATURE** 19
2.1. METABOLIZEM KOSTI 19
2.1.1. ZGRADBA IN SESTAVA KOSTI 20
2.1.2. CELICE, VKLJUČENE V METABOLIZEM KOSTI 23
2.1.3. PREOBLIKOVANJA KOSTNEGA TKIVA 27
2.1.4. REGULACIJA METABOLIZMA KOSTI 30
2.1.4.1. Tkivni hormoni oz. faktorji 30
2.1.4.2. Sistemski hormoni 33
2.1.4.3. ESTROGENI 34
2.1.5. UGOTAVLJANJE METABOLIČNEGA STATUSA KOSTI 36
2.2. BIOKEMIJSKI KAZALCI METABOLIZMA KOSTI 37
2.2.1. BIOKEMIJSKI KAZALCI IZGRAJEVANJA KOSTNINE 37
2.2.1.1. CELOKUPNA ALKALNA FOSFATAZA (ALP) 37
2.2.1.2. KOSTNO SPECIFIČNA ALKALNA FOSFATAZA (bALP) 38
2.2.1.3. OSTEOKALCIN (OCN) 38
2.2.1.4. PROPEPTIDI PROKOLAGENA TIPA 1 39
2.2.1.5. KOSTNI SIALOPROTEIN 40
2.2.2. BIOKEMIJSKI KAZALCI RAZGRAJEVANJA KOSTNINE 40
2.2.2.1. TARTRAT REZISTENTNA KISLA FOSFATAZA (TRAP) 40
2.2.2.2. HIDROKSIPROLIN (HYP) 41
2.2.2.3. HIDROKSILIZIN 41
2.2.2.4. PIRIDINOLINSKE (Pyd) IN DEOKSIPIRIDINOLINSKE (Dpd) PREČNE POVEZAVE KOLAGENA 41

2.2.2.5. PREČNE POVEZAVE KOLAGENA I, VEZANE NA TELOPEPTIDE 42
2.2.2.5.1. PREČNE POVEZAVE KOLAGENA I, VEZANE NA N-TERMINALNE TELOPEPTIDE (NTx) 42
2.2.2.5.2. PREČNE POVEZAVE KOLAGENA I, VEZANE NA C-TERMINALNE TELOPEPTIDE (CTx IN ICTP) 43
2.2.3. ODVZEM IN SHRANJEVANJE VZORCEV KRVI IN URINA ZA PREISKAVO NA KAZALCE KOSTNEGA METABOLIZMA 43
2.2.4. VREDNOTENJE IN INTERPRETACIJA VREDNOSTI KAZALCEV KOSTNEGA METABOLIZMA 44
2.2.5. KLINIČNA UPORABNOST KAZALCEV METABOLIZMA KOSTI 45
2.2.6. GIBANJE KAZALCEV METABOLIZMA KOSTI MED LAKTACIJO IN PRESUŠITVIJO PRI KRAVAH 47
2.3. KALCIJ (Ca) IN FOSFOR (P) PRI GOVEDU 48
2.3.1. FUNKCIJE KALCIJA IN FOSFORJA V ORGANIZMU 49
2.3.2. NARAVNI VIRI KALCIJA 50
2.3.3. METABOLIZEM KALCIJA IN NJEGOVA REGULACIJA 50
2.3.3.1. ABSORPCIJA 50
2.3.3.2. KALCIJ NALOŽEN V KOSTEH 52
2.3.3.3. IZLOČANJE KALCIJA Z URINOM IN IZTREBKI 53
2.3.3.4. PREPREČEVANJE HIPERKALCEMIJE 53
2.3.3.5. PREPREČEVANJE HIPOKALCEMIJE 54
2.3.4. NARAVNI VIRI FOSFORJA 54
2.3.5. METABOLIZEM FOSFORJA 55
2.3.5.1. ABSORPCIJA FOSFORJA PRI ODRASLIH PREŽVEKOVALCIH 55
2.3.5.2. SEKRECIJA FOSFORJA S SLINO PRI PREŽVEKOVALCIH 56
2.3.5.3. IZLOČANJE FOSFORJA Z IZTREBKI IN URINOM 56
2.3.5.4. RAST KOSTI IN MINERALIZACIJA PRI MLADIH ŽIVALIH IN VSEBNOST FOSFORJA V OBROKU 57
2.3.5.5. MINERALIZACIJA KOSTI PRI ODRASLIH ŽIVALIH IN VSEBNOST FOSFORJA V OBROKU 57
2.3.5.6. HORMONSKA REGULACIJA METABOLIZMA FOSFORJA 58
2.3.6. VPLIV PREHRANE NA METABOLIZEM KALCIJA 58
2.3.7. VPLIV PREHRANE NA METABOLIZEM FOSFORJA 60

2.3.8. POTREBE PO KALCIJU IN FOSFORJU 61
2.3.9. VSEBNOST KALCIJA IN FOSFORJA V KRMI 62
2.3.10. POMANJKANJE KALCIJA IN BOLEZNI 64
2.3.11. POMANJKANJE FOSFORJA IN BOLEZNI 65
2.3.12. PREBITEK KALCIJA 67
2.3.13. PREBITEK FOSFORJA 67
2.3.14. GIBANJE SERUMSKEGA KALCIJA IN ANORGANSKEGA FOSFATA MED LAKTACIJO IN PRESUŠITVIJO KRAV 67
2.4. VITAMIN D IN NJEGOVA VLOGA V METABOLIZMU KALCIJA 68
2.4.1. BIOSINTEZA, RAZPAD IN IZLOČANJE VITAMINA D_3 69
2.4.2. MEHANIZEM DELOVANJA VITAMINA D 72
2.4.3. BIOLOŠKI PROCESI, KI JIH NADZORUJE VITAMIN D 72
2.4.4. HIPOVITAMINOZA D 73
2.4.5. HIPERVITAMINOZA D 73
2.4.6. UPORABA VITAMINA D ZA PREVENTIVO OBPORODNE HIPOKALCEMIJE 75
2.5. MAGNEZIJ (Mg) PRI GOVEDU 76
2.5.1. FUNKCIJE MAGNEZIJA V ORGANIZMU 77
2.5.2. NARAVNI VIRI MAGNEZIJA 77
2.5.3. METABOLIZEM MAGNEZIJA 78
2.5.4. VPLIV PREHRANE NA METABOLIZEM MAGNEZIJA 79
2.5.5. POTREBE PO MAGNEZIJU 81
2.5.6. POMANJKANJE MAGNEZIJA 82
2.5.7. PREBITEK MAGNEZIJA 83
2.5.8. GIBANJE SERUMSKE KONCENTRACIJE MAGNEZIJA MED LAKTACIJO IN PRESUŠITVIJO 84
2.6. OBPORODNA HIPOKALCEMIJA 84
2.6.1. EKONOMSKI POMEN BOLEZNI 85
2.6.2. PATOFIZIOLOGIJA IN PATOGENEZA HIPOKALCEMIJE 86
2.6.2.1. DEJAVNIKI, KI PRIPOMOREJO K POJAVU OBPORODNE HIPOKALCEMIČNE PAREZE IN NAM POMAGAJO PRI ZGODNJEM ODKRIVANJU OGROŽENIH KRAV 88
2.6.3. KLINIČNA SLIKA BOLEZNI 90
2.6.4. DIAGNOZA BOLEZNI 92

2.6.5. DIFERENCIALNE DIAGNOZE OBPORODNEGA LEŽANJA 93
2.6.6. TERAPIJA 94
2.6.7. PREVENTIVA BOLEZNI 96
2.6.8. OBVLADOVANJE OBPORODNE HIPOKALCEMIČNE PAREZE 102
2.6.9. RAZISKAVE OBPORODNE HIPOKALCEMIČNE PAREZE, OPRAVLJENE NA KLINIKI ZA PREŽVEKOVALCE VETERINARSKE FAKULTETE UNIVERZE V LJUBLJANI 102
3. **MATERIAL IN METODE** 105
3.1. NAMEN RAZISKAVE 105
3.2. DOVOLJENJE ZA RAZISKAVO 106
3.3. ŽIVALI V POSKUSU 107
3.4. REJA ŽIVALI 108
3.5. KRMA 110
3.6. DAJANJE VITAMINA D_3 IN UPORABLJENI PREPARAT 115
3.7. METEOROLOŠKI PODATKI 116
3.8. JEMANJE VZORCEV KRVI 116
3.9. OPRAVLJENE PREISKAVE 117
3.9.1. MERJENJE KONCENTRACIJE CELOKUPNEGA SERUMSKEGA KALCIJA 117
3.9.2. MERJENJE KONCENTRACIJE SERUMSKEGA ANORGANSKEGA FOSFATA 117
3.9.3. MERJENJE KONCENTRACIJE SERUMSKEGA MAGNEZIJA 118
3.9.4. MERJENJE AKTIVNOSTI CELOKUPNE SERUMSKE ALKALNE FOSFATAZE (ALP) 118
3.9.5. MERJENJE AKTIVNOSTI SERUMSKE KOSTNO SPECIFIČNE ALP (bALP) 119
3.9.6. MERJENJE KONCENTRACIJE SERUMSKIH CTx 119
3.9.7. MERJENJE 17-β-ESTRADIOLA 120
3.9.8. JEMANJE VZORCEV URINA 120
3.9.8.1. MERJENJE pH VREDNOSTI URINA 120
3.10. STATISTIČNA OBDELAVA 121
4. **REZULTATI** 124

4.1. OPISNA STATISTIKA REZULTATOV IZMERJENIH BIOKEMIJSKIH PARAMETROV IN REZULTATI SEMIKVANTITATIVNE OCENE pH VREDNOSTI URINA 124
4.2. VPLIV LETNEGA ČASA IN POPORODNE HIPOKALCEMIČNE PAREZE NA VREDNOSTI BIOKEMIJSKIH PARAMTEROV OB RAZLIČNIH ODVZEMIH 128
4.3. VPLIV DAJANJA VISOKEGA ODMERKA VITAMINA D_3 OB 2. ODVZEMU NA VREDNOSTI Ca, aP, bALP in CTx PRI 3. IN 4. ODVZEMU 148
4.4. NAPOVEDOVANJE VREDNOSTI Ca PO PORODU (3. ODVZEM) S POMOČJO REZULTATOV VREDNOSTI BIOKEMIJSKIH PARAMETROV bALP IN CTx PRED TELITVIJO (2. ODVZEM) 150
4.5. VPLIV ESTRADIOLA NA VREDNOSTI Ca, aP, bALP in CTx PRI POSAMEZNIH ODVZEMIH ZA POLETNO IN ZIMSKO SKUPINO KRAV SKUPAJ 154
4.6. VPLIV KLIMATSKIH RAZMER V ČASU ODVZEMA VZORCEV NA DOBLJENE VREDNOSTI BIOKEMIJSKIH PARAMETROV 154
5. **DISKUSIJA** 156
5.1. KONCENTRACIJA SERUMSKEGA KALCIJA 156
5.2. pH VREDNOSTI URINA 159
5.3. KONCENTRACIJA SERUMSKEGA ANORGANSKEGA FOSFATA 159
5.4. KONCENTRACIJA SERUMSKEGA MAGNEZIJA 161
5.5. AKTIVNOST CELOKUPNE SERUMSKE ALKALNE FOSFATAZE 164
5.6. MERJENJE SPECIFIČNIH SERUMSKIH KAZALCEV METABOLIZMA KOSTI 166
5.6.1. AKTIVNOST SERUMSKE KOSTNO SPECIFIČNE ALKALNE FOSFATAZE (bALP) 166
5.6.2. KONCENTRACIJA SERUMSKIH CTx 169
5.7. KONCENTRACIJA SERUMSKEGA 17-β-ESTRADIOLA 171
5.8. VPLIV ESTRADIOLA NA VREDNOSTI Ca, aP, bALP IN CTx PRI POSAMEZNIH ODVZEMIH ZA POLETNO IN ZIMSKO SKUPINO KRAV SKUPAJ 173
5.9. VPLIV DAJANJA VISOKEGA ODMERKA VITAMINA D_3 OB 2. ODVZEMU NA VREDNOSTI Ca, aP, bALP IN CTx PRI 3. IN 4.

ODVZEMU 175

5.10. NAPOVEDOVANJE VREDNOSTI Ca PO PORODU (3. ODVZEM) S POMOČJO REZULTATOV VREDNOSTI BIOKEMIJSKIH PARAMETROV PRED TELITVIJO (2. ODVZEM) 176

5.11. VPLIV KLIMATSKIH RAZMER V ČASU ODVZEMA VZORCEV NA DOBLJENE VREDNOSTI BIOKEMIJSKIH PARAMETROV 178

6. **ZAKLJUČKI** 182

7. **POVZETEK** 184

8. **SUMMARY** 187

9. **ZAHVALA** 190

10. **REFERENCE** 191

11. **PRILOGE** 210

11.1. VREDNOSTI IZMERJENIH BIOKEMIJSKIH PARAMETROV PRI POSAMEZNIH KRAVAH 211

SEZNAM OKRAJŠAV

° C	stopinja celzija
µmol	mikromol
1,25-$(OH)_2D_3$	kalcitriol (1α, 25-dihidroksiholekalciferol)
25-OHD_3	kalcidiol
1α$(OH)_2D_3$	1α-hidroksiholekalciferol
Å	ångström, enota za dolžino, 1 x 10^{-10} m
ACH	acetilholin
Al	aluminij
ALP	celokupna alkalna fosfataza
AP	pred telitvijo
aP	anorganski fosfati (PO_4^{3-}, PO_4^{2-} in PO_4^{-}) v krvi
AST	aspartat aminotransferaza
ATP	adenozin tri fosfat
ATPaza	encimi iz skupine hidrolaz, ki potrebujejo za svojo aktivnost ATP
AUC	površina pod krivuljo (area under the curve)
bALP	kostno specifična alkalna fosfataza
BCS	ocena telesne kondicije krave (body condition scoring)
BRU ali BMU	bone remodeling unit ali bone metabolism unit
BSP	kostni sialoprotein
Ca	kalcij
$CaCl_2$	kalcijev klorid
CTx	prečne povezave kolagena I vezane na C terminalne telopeptide
ČB	slovenska črno-bela pasma goveda
DBP	vitamin D vezoča beljakovina
DCAD	razlika med kationi in anioni v obroku (dietary cation anion difference), lahko tudi DCAB (dietary cation anion balance)
Dpd	deoksipiridinolinske prečne povezave kolagena I
ECLIA	elektrokemiluminiscentna imunoanaliza (ang. Electrochemiluminescence Immunoassay)
ELISA	encimskoimunski test
EUR	Evro
F	F-statistika = testna statistika preizkusa domneve o enakosti varianc
FSH	folikel stimulirajoči hormon
g	gram
GGHYL	glukozil-galaktozil-hidroksilizin
GHYL	galaktozil-hidroksilizin
GI	gastro-intestinalni
Gly	glicin
HCl	klorovodikova kislina
HF	holštajn frizijska pasma goveda
HPLC	tekočinska kromatografija pod visokim tlakom
Hyp ali OHP	hidroksiprolin

ICTP	nekoliko drugačna oblika prečnih povezav kolagena I vezanih na C terminalne telopeptide od CTx
IE	internacionalne enote (merilo za količino snovi na osnovi njenega biološkega delovanja ali učinka)
IL	interlevkini
IUPAC-IUB	Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo in Mednarodna zveza za biokemijo in molekularno biologijo
i.v.	intra venozno
IZ	interval zaupanja
K	kalij
kg	kilogram
L	liter
LH	luteinizirajoči hormon
M	milijon
Max.	najvišja izmerjena vrednost v skupini podatkov
mEq	miliekvivalenti (atomska masa / nabojem)
Mg	magnezij
MgO	magnezijev oksid
Min.	najnižja izmerjena vrednost v skupini podatkov
mmol	milimol
mRNA	informacijska (messenger) ribonukleinska kislina
n	število (numerus)
Na	natrij
NEL	neto energija laktacije
NO	dušikov oksid
nmol	nanomol
NRC	The national research council
NTx	prečne povezave kolagena I vezane na N terminalne telopeptide
OPG	osteoprotagerin
OC	osteoklast
OCN	osteokalcin ali kostni Gla protein
p	p-vrednost = najmanjša verjetnost, pri kateri je mogoče zavreči ničelno hipotezo pri obravnavanih vzorčnih podatkih
P	fosfor
P1CP	karboksiterminalni propeptidi kolagena I
P1NC	aminoterminalni propeptidi kolagena I
PB	prebavljive beljakovine
pH	merilo za koncentracijo hidronijevih ionov v raztopini in s tem posledično za njeno kislost ali alkalnost
PH	puerperalna (obporodna) hipokalcemična pareza
PP	po telitvi
Pro	prolin
PTH	paratiroidni hormon, parathormon
PTHrP	paratiroidnemu hormonu sorodna beljakovina

Pyd	piridinolinske prečne povezave kolagena I
r	Pearsonov korelacijski koeficient
R^2	koeficient determinacije
RANKL	aktivator receptorja jedrnega faktorja, kappa beta ligand
RANK	receptor za RANKL (na prekurzorskih celicah osteoklastov)
RIA	radiološkoimunski test
RNA	ribonukleinska kislina
ROC	receiver operating characteristic
S	žveplo
SB	surove beljakovine
SD	standardna deviacija (odklon)
SO_4^{--}	sulfat, poliatomski anion žveplove (IV) kisline
sod.	sodelavci
SPSS	Statistical package for social sciences
SS	suha snov
SV	surova vlaknina
ŠE	škrobne enote
τ	Kendallov koeficient korelacije rangov
t	t-statistika = testna statistika preizkusa domneve o razliki povprečij
T_3	trijodtironin
tCa	celokupni kalcij
TNF	tumorski nekrozni faktor
TRAP	tartrat rezistentna kisla fosfataza
TRPV5 in TRPV6	Ca kanalčka v enterocitih
t.t.	telesna teža
UV	ultravijolična
vit.	vitamin
$\overline{X}$	aritmetična sredina ali povprečna vrednost

SEZNAM TABEL

Tabela 1: Trivialna nomenklatura snovi iz skupine vitamina D (Osredkar in Marec, 1996) 68
Tabela 2: Verjetnosti nastanka drugih bolezni pri kravah, obolelih za obporodno parezo (Curtis in sod., 1983) 91
Tabela 3: Število odvzemov vzorcev po posameznih skupinah glede na fiziološka obdobja preiskovanih krav 108
Tabela 4: Skupna in povprečna prireja krav na farmi Grmače v letu 2007 in 2008 109
Tabela 5: Sestava mix obroka za krave v poskusu 111
Tabela 6: Kemijska sestava mix obroka za posamezne kategorije krav, preračunana na SS obroka 112
Tabela 7: Kemijska analiza koruzne silaže letnik 2006 in 2007 112
Tabela 8: Kemijska analiza travne silaže letnik 2006 in 2007 (% v SS, razen suhe snovi in vlage) 113
Tabela 9: Kemijska analiza sena pridelanega leta 2007 (% v SS, razen suhe snovi in vlage) 113
Tabela 10: Kemijska analiza paše, junij 2007 (% v SS, razen suhe snovi in vlage) 114
Tabela 11: Faktorji za preračunavanje % v SS v mEq/kg v SS za izračun DCAD 115
Tabela 12: Opisna statistika biokemijskih parametrov po odvzemih (fizioloških obdobjih) pri skupini 15 krav v poletnem obdobju (skupina I), 14 krav v zimskem obdobju (skupina II) in 14 krav s hipokalcemično poporodno parezo (skupina III) 125
Tabela13: Opisna statistika rezultatov pri skupini 13 krav (IV skupina), ki so po drugem odvzemu dobile visok odmerek vitamina D_3 127
Tabela 14: Aritmetična sredina ± SD in statistična pomembnost razlik meritev Ca po odvzemih (fizioloških obdobjih) pri skupini 15 krav v poletnem obdobju (skupina I), 14 krav v zimskem obdobju (skupina II) in 14 krav s hipokalcemično poporodno parezo (skupina III) 128
Tabela 15: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Odvzemi in za interakcijo Odvzemi*Skupine za parameter Ca 129
Tabela 16: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Skupine za parameter Ca 130
Tabela 17: Aritmetična sredina ± SD in statistična pomembnost razlik meritev aP po odvzemih (fizioloških obdobjih) pri skupini 15 krav v poletnem obdobju (skupina I), 14 krav v zimskem obdobju (skupina II) in 14 krav s hipokalcemično poporodno parezo (skupina III) 132
Tabela 18: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Odvzemi in za interakcijo Odvzemi*Skupine za parameter aP 133
Tabela 19: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Skupine za parameter aP 133
Tabela 20: Aritmetična sredina ± SD in statistična pomembnost razlik meritev Mg po odvzemih (fizioloških obdobjih) pri skupini 15 krav v poletnem obdobju (skupina I), 14 krav v zimskem obdobju (skupina II) in 14 krav s

hipokalcemično poporodno parezo (skupina III) 135
Tabela 21: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Odvzemi in za interakcijo Odvzemi*Skupine za parameter Mg 136
Tabela 22: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Skupine za parameter Mg 136
Tabela 23: Aritmetična sredina ± SD in statistična pomembnost razlik meritev ALP po odvzemih (fizioloških obdobjih) pri skupini 15 krav v poletnem obdobju (skupina I), 14 krav v zimskem obdobju (skupina II) in 14 krav s hipokalcemično poporodno parezo (skupina III) 137
Tabela 24: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Odvzemi in za interakcijo Odvzemi*Skupine za parameter ALP 138
Tabela 25: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Skupine za parameter ALP 139
Tabela 26: Aritmetična sredina ± SD in statistična pomembnost razlik meritev bALP po odvzemih (fizioloških obdobjih) pri skupini 15 krav v poletnem obdobju (skupina I), 14 krav v zimskem obdobju (skupina II) in 14 krav s hipokalcemično poporodno parezo (skupina III) 140
Tabela 27: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Odvzemi in za interakcijo Odvzemi*Skupine za parameter bALP 141
Tabela 28: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Skupine za parameter bALP 141
Tabela 29: Aritmetična sredina ± SD in statistična pomembnost razlik meritev CTx po odvzemih (fizioloških obdobjih) pri skupini 15 krav v poletnem obdobju (skupina I), 14 krav v zimskem obdobju (skupina II) in 14 krav s hipokalcemično poporodno parezo (skupina III) 142
Tabela 30: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Odvzemi in za interakcijo Odvzemi*Skupine za parameter CTx 143
Tabela 31: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Skupine za parameter CTx 144
Tabela 32: Aritmetična sredina ± SD in statistična pomembnost razlik meritev estradiola po odvzemih (fizioloških obdobjih) pri skupini 15 krav v poletnem obdobju (skupina I), 14 krav v zimskem obdobju (skupina II) in 14 krav s hipokalcemično poporodno parezo (skupina III) 145
Tabela 33: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Odvzemi in za interakcijo Odvzemi*Skupine za parameter estradiol 146
Tabela 34: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Skupine za parameter estradiol 147
Tabela 35: Statistična pomembnost virov variabilnosti za nihanja povprečnih vrednosti merjenih parametrov 148
Tabela 36: Deskriptivna analiza vrednosti Ca, aP, bALP, CTx in statistična pomembnost razlike pri 3. odvzemu (0 do 48 ur PP) v zimskem obdobju; pri kravah, ki so dobile vitamin D_3 in tistih, ki ga niso 149
Tabela 37: Deskriptivna anliza vrednosti Ca, aP, bALP, CTx in p vrednost pri kravah v zimskem obdobju, ki so dobile vitamin D_3 in tistih, ki ga niso, pri 4.

odvzemu (10 do 20 dni PP) 149
Tabela 38: Povprečne vrednosti ± SD klimatskih parametrov v zimskem obdobju med posameznimi odvzemi 154
Tabela 39: Povprečne vrednosti ± SD klimatskih parametrov v poletnem obdobju med posameznimi odvzemi 155
Tabela 40: Vrednosti izmerjenih biokemijskih parametrov pri posameznih kravah, vključenih v poskus po odvzemih 211

SEZNAM GRAFIKONOV

Grafikon 1: Gibanje estradiola (E2) od obrejitvije do poroda pri Holštajn frizijskem govedu po in vitro fertilizaciji in embrio transferu; s krogi je označeno gibanje pri kravah z enim plodom, s kvadrati pa pri kravah, ki nosijo dva ploda (po Patel in sod., 1999). 35
Grafikon 2a,b: Regresijski premici, ki prikazujeta odvisnost koncentracije Ca ob 3. odvzemu od koncentracije bALP ob 2. odvzemu (y=2.098 – 0.023*x) in od koncentracije CTx ob 2. odvzemu (y=2.257 – 3.823*x) 151
Grafikon 3: ROC krivulja za biokemični parameter bALP pri zimski skupini 152
Grafikon 4: ROC krivulja za biokemični parameter CTx pri zimski skupini 152
Grafikon 5: ROC krivulja za biokemični parameter bALP pri zimski in poletni skupini skupaj 153
Grafikon 6: Gibanje koncentracije povprečnih vrednosti celokupnega serumskega Ca (mmol/L) pri molznicah v štirih fizioloških obdobjih (odvzemi) v poletnem (I) in zimskem (II) času ter pri tistih s PH (III) 156
Grafikon 7: Gibanje koncentracije povprečnih vrednosti serumskega aP (mmol/L) pri molznicah v štirih fizioloških obdobjih (odvzemi) v poletnem (I) in zimskem (II) času ter pri tistih s PH (III) 160
Grafikon 8: Gibanje koncentracije povprečnih vrednosti serumskega Mg (mmol/L) pri molznicah v štirih fizioloških obdobjih (odvzemi) v poletnem (I) in zimskem (II) času ter pri tistih s PH (III) 162
Grafikon 9: Gibanje povprečnih vrednosti aktivnosti celokupne serumske ALP (U/L) pri molznicah v štirih fizioloških obdobjih (odvzemi) v poletnem (I) in zimskem (II) času ter pri tistih s PH (III) 164
Grafikon 10: Gibanje povprečnih vrednosti aktivnosti serumske bALP (U/L) pri molznicah v štirih fizioloških obdobjih (odvzemi) v poletnem (I) in zimskem (II) času ter pri tistih s PH (III) 167
Grafikon 11: Gibanje povprečnih vrednosti koncentracije serumskih CTx (ng/mL) pri molznicah v štirih fizioloških obdobjih (odvzemi) v poletnem (I) in zimskem (II) času ter pri tistih s PH (III) 169
Grafikon 12: Gibanje povprečnih vrednosti koncentracije serumskega estradiola (nmol/L) pri molznicah v štirih fizioloških obdobjih (odvzemi) v poletnem (I) in zimskem (II) času ter pri tistih s PH (III) 172

SEZNAM FOTOGRAFIJ

Fotografija 1: Osteon (200x, HE) 20
Fotografija 2: Vzdolžni in prečni prerez demineraliziranega osteoida trabekularne kostnine; vidijo se nepravilno urejene kolagenske molekule in proteoglikanski agregati (398 × 293 pixlov) (vir: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Woven_bone_matrix.jpg) 21
Fotografija 3: Vzdolžni prerez tibije podgane čez metafizo in del diafize; endohondralna osifikacija (HE, 40x) 23
Fotografija 4: Osteoklasta (pri levem lepo viden zalivček) med resorpcijo kostnega tkiva (razločiti se da osteon) (HE, 200x) 24
Fotografija 5: Osteoblasti (primarna osifikacija) (HE, 400x) 25
Fotografija 6: Prečni prerez osteona, osnovne gradbene enote lamelarne kostnine. Vidni so osteociti med koncentrično razporejenimi lamelami kostnine okoli Haversovega kanala. Med sosednjima ostenonoma se vidijo cementne linije (HE, 200x). 26
Fotografija 7: Osteoklast in osteoblasti v Haversonovem kanalu med preoblikovanjem kosti – razgradnja in izgradnja kostnine potekata hkrati, spodaj se vidi bolj živo rdeč na novo izgrajeni osteoid pod osteoblasti, zgoraj je osteoklast, proti desnem zgornjem kotu fotografije gre Volkmanov kanal (HE, 400x). 29

SEZNAM SHEM

Shema 1: Zgradba molekule kolagena tip 1 (Devlin, 1997) 22
Shema 2: Proces preoblikovanja kostnega tkiva z vidika komunikacije med celicami 28
Shema 3: 17-β-Estradiol 35
Shema 4: Nastajanje kalciola v koži 69
Shema 5: Bioaktivacija 7-dehidroholesterola do aktivne oblike Vit. D_3 70
Shema 6: Regulacija nastajanja kalcitriola v ledvicah 71
Shema 7: Bilanca Ca pri okoli 600 kg kravi, ki proizvaja od 20 do 50 L mleka na dan 87
Shema 8: Holekalciferol – struktura; molska masa je 384,63766 [g/mol], molekulska formula $C_{27}H_{44}O$ 116

DINAMIKA BIOKEMIJSKIH KAZALCEV METABOLIZMA KOSTI KRAV MOLZNIC, TRETIRANIH Z VISOKIM ODMERKOM VITAMINA D_3, KOT PREVENTIVA OBPORODNE HIPOKALCEMIJE

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: veterinarska medicina; kosti – metabolizem; hipokalcemija – preprečevanje in nadzor; biološki markerji; kri, kemične analize; vitamin D; estradiol; kolagen – kri; letni čas; obporodno obdobje, motnje; govedo

Biokemijski kazalci metabolizma kosti so produkti razgradnje ali stranski produkti izgradnje in encimi, ki sodelujejo pri presnovi kostnine in prehajajo iz okostja v krvni obtok. Povejo nam, ali se v času odvzema vzorcev krvi ali urina, kjer jih ugotavljamo, kostnina intenzivneje izgrajuje, razgrajuje ali preoblikuje. V naši raziskavi smo v krvi merili koncentracijo prečnih povezav kolagena 1 vezanih na C – terminalne telopeptide (CTx) - kazalec razgradnje kostnine, aktivnost kostno specifične alkalne fosfataze (bALP) - kazalce izgrajevanja kostnine, aktivnost skupne alkalne fosfataze ALP, koncentracijo mineralov kalcija (Ca), anorganskih fosfatov (aP) in magnezija (Mg) ter koncentracijo 17β estradiola v krvnem serumu krav molznic slovenske črno-bele pasme. Ob jemanju vzorcev smo beležili tudi nekatere vremenske parametre. V raziskavo je bilo vključenih 56 krav, ki so bile pred četrto ali višjo telitvijo. Vzorce krvi smo jim vzeli približno 1 mesec pred telitvijo, znotraj 10 dni pred telitvijo, znotraj 48 ur po telitvi in 10 do 20 dni po telitvi. Krave, ki so obolele zaradi poprodne hipokalcemične pareze smo vključili v posebno skupino. Prav tako smo krave, ki jim je bil pred telitvijo apliciran visok odmerek vitamina D_3 obravnavali v ločeni skupini. Ugotovili smo, da fiziološko obdobje, obolevnost za poporodno parezo, koncentracija 17-β-estradiola in tudi nekateri vremenski dejavniki pri določenih odvzemih statistično značilno ($p<0,05$) vplivajo na vrednosti nekaterih preiskovanih biokemijskih parametrov v naši raziskavi. Dajanje visokega odmerka vitamina D_3 pred telitvijo zmanjšuje pojavnost obporodne hipokalcemične pareze, nima pa statistično značilnega vpliva ($p>0,05$) na vrednosti merjenih biokemijskih parametrov. Pomembna ugotovitev raziskave je tudi uporabnost merjenja biokemijskih kazalcev metabolizma kosti pred telitvijo za zgodnje odkrivanje krav, ki so v nevarnosti, da bodo po telitvi obolele zaradi hipokalcemične pareze.

DYNAMICS OF BIOCHEMICAL MARKERS OF BONE METABOLISM IN DAIRY COWS TREATED WITH HIGH DOSE OF VITAMIN D_3 AS PREVENTION AGAINST MILK FEVER

ABSTRACT

KEY WORDS: veterinary medicine; bone and bones – metabolism; hypocalcemia – preentive and control; biological markers; blood chemical analysis; vitamin D; estradiol; collagen – blood; seasons; puerperal disorders; cattle

Biochemical markers of bone metabolism are degradation products, byproducts of formation and enzymes involved in bone resorption or formation that are released from bone tissue into circulation. They indicate whether bone is forming, degrading or remodeling more intensively at the time of blood and/or urine collection where we measure them. In our study we measured concentration of C-terminal telopeptide crosslaps of the collagen type I (CTx), bone resorption marker, activity of bone specific alkaline phosphatase (bALP), bone formation marker, activity of alkaline phosphatase ALP, concentration of minerals calcium (Ca), inorganic phosphate (iP), magnesium (Mg) and 17-β-estradiol in blood serum of Holstein Friesian cows. Some climatic parameters were also recorded during sampling time. Fifty-six cows before at least the 4th or higher lactation were included in the study. We monitored and obtained blood samples from investigated animals in summer and in winter at different physiological periods during periparturient time: 1 month before calving, 10 or less days before calving, within 48 hours after calving and 10 to 20 days in lactation. Cows that developed milk fever after calving were included in a separate group. Cows that were treated with high doses of vitamin D_3 before calving were also included in a separate group after calving. We established that physiological period, milk fever, estradiol level and certain weather parameters at certain physiological periods had statistically significantly ($p<0.05$) influence values of investigated biochemical parameters in our study. Administration of high doses of vitamin D_3 before calving lowered incidence of milk fever but did not have significant influence ($p>0.05$) on measured biochemical values. Values of biochemical markers of bone metabolism before calving prove useful also as early predictors of cows at risk of developing milk fever after calving.

1 UVOD

Metabolizem kosti je neprestan dinamičen proces preoblikovanja kosti oziroma razgradnje stare kostnine in izgradnje nove. S tem procesom se ohranja kvaliteta kostnine (prožnost, trdnost), prilagaja obremenitvam in v času pomanjkanja mineralov, predvsem kalcija (Ca), preskrbuje organizem z njim. Pri govedu v intenzivni mlečni proizvodnji je metabolizem kosti še posebej intenziven zaradi preskrbe organizma s Ca, po katerem v ožjem obporodnem obdobju in do viška laktacije potrebe močno narastejo. Molznice ga samo z zaužito hrano ne morejo zadovoljiti, ampak morajo črpati svoje telesne rezerve Ca, naložene v okostju. Metabolizem Ca in tudi metabolizem kosti je strogo hormonsko reguliran. Najpomembnejša hormona, ki regulirata metabolizem Ca, sta paratiroidni hormon (PTH) in aktivna oblika vitamina D_3, 1,25-dihidroksiholekalciferol (1,25-$(OH)_2D_3$). Vzrok za nastanek hipokalcemije pri kravah molznicah je največkrat nezadostna aktivnost homeostatskih mehanizmov, ki uravnavajo koncentracijo Ca v krvi.

Biokemijski kazalci metabolizma kosti so stranski produkti izgradnje ali produkti resorpcije kostnine in encimi, povezani s tem procesom, ki prehajajo iz okostja v krvni obtok. Kažejo na aktivnost kostnega metabolizma v času jemanja vzorcev krvi in/ali urina, v katerih te parametre merimo. Med izgrajevanjem kostnine (anabolična aktivnost) so metabolično bolj aktivni osteoblasti. Biološki produkti osteoblastne aktivnosti so kazalci izgrajevanja kostnine, npr. kostno specifični encim *kostna alkalna fosfataza (bALP)* in *skupna serumska alkalna fosfataza (ALP), osteokalcin (OCN)* in *propeptidi prokolagena I*. Med razgrajevanjem ali resorpcijo kostnine (katabolična aktivnost) pa so metabolično bolj aktivni osteoklasti, katerih biološki kazalci aktivnosti so kazalci resorpcije kostnine, npr. encim *tartrat rezistentna kisla fosfataza (TRAP), C-terminalni* in *N-terminalne prečne povezave, vezane na telopeptide kolagena I (CTx), hidroksiprolin (HYP), piridinolin* in *deoksipiridinolin (DPD)*. Glede na vrednosti kazalcev kostnega metabolizma lahko sklepamo ali je v času odvzema vzorca metabolizem kosti usmerjen bolj k izgrajevanju, razgrajevanju ali je na splošno bolj oz. manj aktiven. Merjenje kazalcev metabolizma kosti pri govedu je bilo do sedaj redko izvedeno in večinoma pri kravah v obporodnem obdobju (Chiappe in Capaul, 1985; Mosel in Corlett, 1990; Naito in sod., 1990; Lappeteläine in sod., 1993; Liesegang in sod., 1998; Liesegang in sod., 2000; Larsen in sod., 2001; Sato in sod., 2002; Ekelund, 2003; Iwama in sod., 2004; Holtenius in Ekelund, 2005; Sato in sod., 2005; Yamagishi in sod., 2005; Kurosaki in sod.,

2007a; Filipović in sod., 2008; Starič in sod., 2008; Taylor in sod., 2008; Taylor in sod. 2009).

Namen naloge je preučevanje in merjenje kazalcev kostnega metabolizma in s tem posredno tudi metabolizma Ca v krvnem serumu črno-belih (ČB) krav pred vsaj 4. ali višjo laktacijo v obporodnem obdobju v zimskem in poletnem času. V poletnem času so krave vsakodnevno tudi na paši (vpliv gibanja na soncu). Nadalje želimo v nalogi ugotoviti, ali ima dajanje visoke doze vitamina D_3 2 do 10 dni pred telitvijo vpliv na kostni metabolizem. Zelo pomembno vprašanje, na katerega želimo odgovoriti, je tudi, ali se z merjenjem vrednosti kazalcev kostnega metabolizma pred telitvijo lahko ugotovi, ali je krava v nevarnosti, da bo po telitvi obolela zaradi hipokalcemične pareze. V ta namen bomo spremljali aktivnost kostno specifičnega encima *kostna alkalna fosfataza (bALP)* kot kazalca izgradnje kostnine in koncentracijo razgradnega produkta kolagena I, *C-terminalnih prečnih povezav vezanih na telopeptide (CTx)* kot kazalca razgradnje kostnine. Hkrati bomo spremljali tudi koncentracijo Ca, magnezija (Mg) in anorganskega fosfata (aP), aktivnost encima celokupne ALP ter 17-β-estradiola v krvnem serumu. Za hkratno spremljanje serumskega Mg in aP smo se odločili, ker sta pomembna sestavina kosti in ker so kosti tudi največji depo teh dveh mineralov. Ob merjenju omenjenih biokemijskih parametrov in spremljanju zdravstvenega stanja krav bomo hkrati beležili tudi nekaj parametrov trenutnega vremenskega dogajanja (povprečna dnevna temperatura, najnižja dnevna temperatura, najvišja dnevna temperatura, sprememba T (razlika med najvišjo in najnižjo dnevno T), povprečna dnevna vlaga, povprečni dnevni zračni tlak in količina padavin).

Glede na podatke iz literature pričakujemo, da je metabolizem kosti v času presušitve usmerjen bolj k izgradnji kostnine (v tem času so najmanjše potrebe po Ca zaradi majhnih potreb za vzdrževanje živali in rast ploda ter nizke proizvodnje mleka, za kar je značilna višja aktivnost encima bALP in nižja koncentracija CTx v krvnem serumu; krave niso v negativni metabolični bilanci Ca). Na začetku laktacije (največkrat je to takoj po porodu, včasih pa že pred porodom zaradi intenzivne sinteze kolostruma) naglo pride do močnega povečanja potreb po Ca, na katere mora metabolizem krave hitro odgovoriti, da ne pride do metabolične motnje obporodne hipokalcemije. Zaradi pomanjkanja Ca v krvi se v tem času kostnina ne izgrajuje, intenzivna pa je razgradnja kostnine (nižja aktivnost bALP in višja koncentracija CTx). Pričakujemo vpliv metabolizma kosti na koncentracijo aP in Mg v krvnem serumu, ki ni tako strogo hormonsko reguliran kot Ca. 17β estradiol ima močan anabolični učinek na okostje, zato pričakujemo, da bo njegova serumska koncentracija negativno povezana z vsebnostjo serumskega Ca in pozitivno z aktivnostjo bALP. V poletnem času pričakujemo

zaradi večje fizične aktivnosti in obsevanja s sončno svetlobo (UV žarki, ki so potrebni za biosintezo vitamina D) bolj aktiven kostni metabolizem in manjšo pojavnost hipokalcemičnih parez kot v zimskem času.

Pri kravah s puerperalno hipokalcemijo pričakujemo slabšo aktivnost mehanizmov resorpcije Ca in mogoče tudi na splošno slabšo aktivnost kostnega metabolizma. Pričakujemo tudi, da se pred telitvijo krav iz vrednosti kazalcev kostnega metabolizma lahko ugotovi, ali je krava rizična za poporodno hipokalcemično parezo.

2 PODATKI IZ LITERATURE

2.1 METABOLIZEM KOSTI

Pri vretenčarjih imajo kosti številne funkcije. Ščitijo organe v telesu in hematopoetični kostni mozeg. V kostnem matriksu se shranjujejo, v obdobju pomanjkanja pa se iz njega sproščajo življenjsko pomembni ioni, npr. kalcij. Iz kosti se sproščajo tudi rastni faktorji. Kosti so nenazadnje pomembne tudi kot opora mišic in s tem za gibanje ter obliko telesa.

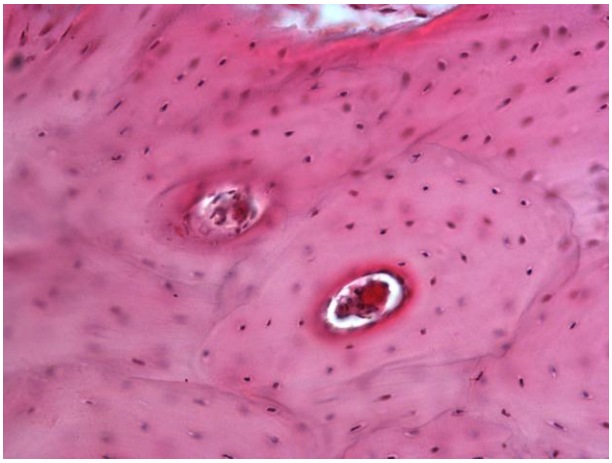
Metabolizem kostnega tkiva je nepretrgan dinamičen proces oblikovanja in preoblikovanja kostnega tkiva. Kosti se oblikujejo v času rasti okostja, ko pa okostje odraste, se le še preoblikuje. Kljub temu, da so izgrajene kosti videti metabolično neaktivne, so v resnici zelo dinamičen organ, pod aktivnim nadzorom osteoblastov in osteoklastov. Preoblikovanje označuje tesno povezano razgradnjo stare kostnine in nadomeščanje le te z izgradnjo nove (Allen, 2003). Preoblikovanje kostnega tkiva naj bi stimulirali različni dejavniki, vključno z nastankom kostnih mikrofraktur, izguba ali povečanje obremenitve, hipokalcemija, spremembe statusa hormonov in citokinov. Tako se okostje stalno obnavlja s procesom preoblikovanja kostnega tkiva, kar ohranja prožnost in trdnost, oz. kvaliteto kosti. Na ta način se kosti tudi prilagajajo fizični obremenitvi (če je kost močno obremenjena, se debeli, lahko celo nekoliko spremeni obliko) (Christenson, 1997; Allen, 2003). Kostno tkivo kot največje skladišče kalcija, fosforja in magnezija v telesu je povezano tudi z metabolizmom omenjenih mineralov. Pri ljudeh se lahko pod vplivom hormonov v nekaj dnevih mobilizira 1 do 2% celotnega telesnega kalcija naloženega v okostju (Cundy in Reid, 1995).

Preoblikovanje kosti poteka v več fazah, vedno na površini kosti in kostnih pregrad. Mesta preoblikovanja se imenujejo enote kostnega metabolizma oz. enote preoblikovanja kosti (angleško: bone metabolism unit (BMU) oz. bone remodeling unit (BRU)) - oba izraza sta veljavna in se uporabljata v literaturi. Skupni metabolizem kosti kosti organizma predstavlja seštevek delovanja v vseh BRU (Christenson, 1997; Allen, 2003).

Zaradi stalnega in zelo živahnega metabolizma kosti po celotnem okostju vsaka motnja nastajanja kosti ali neskladje med razgradnjo in izgradnjo kostnine v določenem časovnem obdobju poslabša kvaliteto kosti.

2.1.1 ZGRADBA IN SESTAVA KOSTI

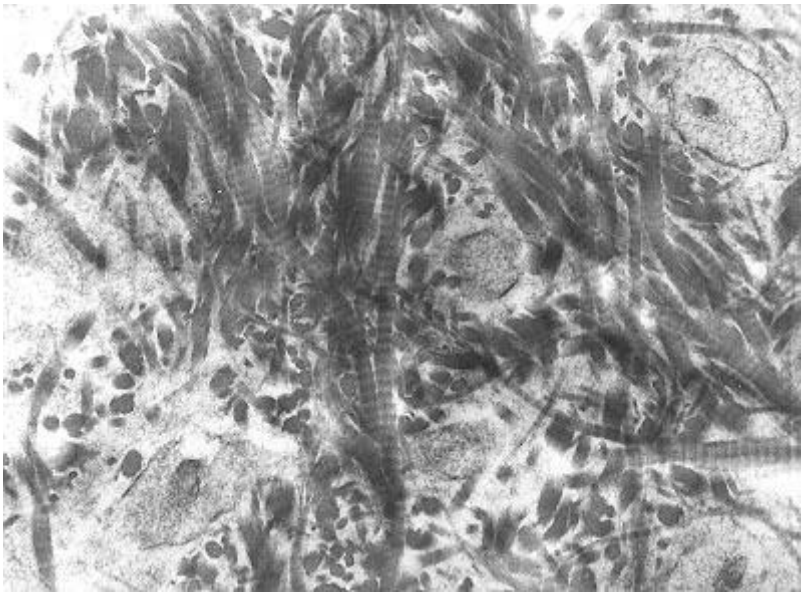
Ločimo dva osnovna tipa kostnine: kortikalno (latinsko *Substantia corticalis*) – obdaja kosti in je čvrsta; v diafizi dolgih cevastih kosteh se še posebej izrazi njena čvrstost in ji zato nekateri rečejo tudi kompaktna kostnina (latinsko *Substantia compacta*) in trabekularno (latinsko *Substantia spongiosa*). Kortikalna kostnina predstavlja približno 80% mase skeleta človeka, preostalo pa je trabekularna kostnina. Osemdeset do 90% kompaktne kostnine je pri odraslem človeku mineralizirane. Njena struktura je urejena, setavljena iz značilnih vzporednih in koncentričnih lamel, ki se tesno prilegajo druga k drugi ter tako tvorijo osteone, osnovne gradnike kortikalne kostnine. Urejena struktura ji daje čvrstost, ki ji omogoča, da lahko opravlja svojo mehansko, podporno in zaščitno funkcijo. Metabolična aktivnost kortikalne kostnine je relativno nizka.



Fotografija 1: Osteon (HE, 200x), arhiv fotografij Jože Starič

Trabekularna kostnina je glede na kortikalno kostnino metabolično bolj aktivna. Mineralizirana je le 5 - 20% in je za razliko od kortikalne kostnine nepravilne strukture, ni sestavljena iz osnovnih gradbenih enot osteonov. Osteociti so v kostnem matriksu neurejeno razporejeni. Zaradi nepravilne mreže trabekul, ki jo tvorijo, ima zelo veliko površino. Na trabekularno kostnino odpade kljub temu, da tvori kar 4 krat manjši delež mase celotnega skeleta, kar 2/3 površine skeleta, na kortikalno kostnino pa le 1/3 (Christenson, 1997). Swaminathan (2001) pa navaja pri človeku, da trabekularna kostnina prispeva kar 80% kostnih površin. To je pomembno, ker potekajo presnovni procesi le na površini kosti.

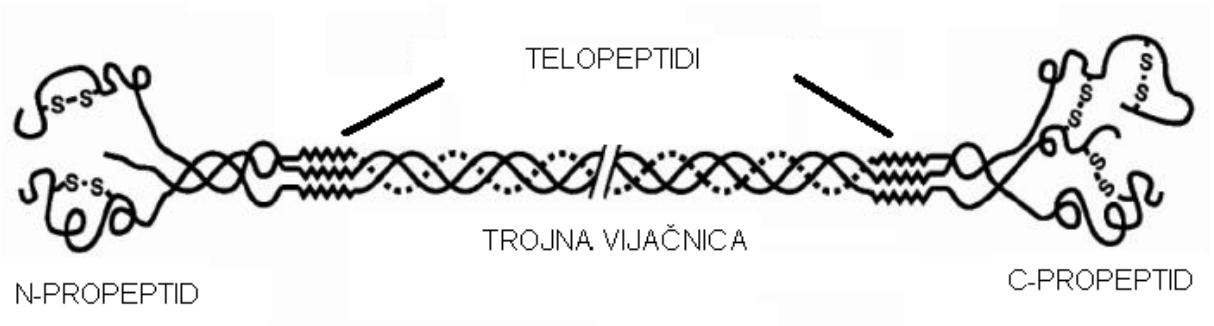
Biokemično je kost sestavljena iz organskih in anorganskih sestavin. Trideset odstotkov kostne mase človeka predstavlja organska masa t.i. osteoid, ki se z nalaganjem kalcijevih soli stabilizira. Glikoprotein kolagen tipa I predstavlja več kot 90% organskega kostnega matriksa (Christenson, 1997). Pri ljudeh predstavlja kar 23% mase kortikalne kostnine. V kosteh ga je daleč največ v telesu in tu se tudi najhitreje razgrajuje in sintetizira. Sestavljen je iz treh vijačnic (dveh α1 in ene α2), v katerih imajo velik delež aminokisline glicin, prolin in hidroksiprolin, ki se ponavljajo v tripletih Gly-Pro-X in Gly-X-Hyp (X = katerakoli aminokislina). Tako zaporedje omogoča nastanek superhelične strukture molekule kolagena tipa I. Molekula kolagena tipa I je dolga kar 3000 Å, široka pa le 15 Å. Hidroksiprolin je značilna aminokislina za kolagen, ki nastaja z encimatsko hidroksilacijo prolina med posttranslacijskim procesiranjem. Reakcija zahteva prisotnost askorbinske kisline oz. vitamina C (Devlin, 1997).



Fotografija 2: Vzdolžni in prečni prerez demineraliziranega osteoida trabekularne kostnine; vidijo se nepravilno urejene kolagenske molekule in proteoglikanski agregati (398 × 293 pixlov)
(vir: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Woven_bone_matrix.jpg)

Kolagen tipa I nastaja iz prekurzorja prokolagena z relativno dolgimi N in C terminalnimi propeptidi, ki se pri tvorbi končnega kolagena I odcepljajo. Molekule prokolagena sintetizirajo osteoblasti in jih izločajo v medceličnino, kjer se združujejo v zrel kolagen. Kolagen tipa I se od drugih vrst kolagena v organizmu razlikuje tudi po tem, da vsebuje

hidroksilizilpiridinolin in lizilpiridinolin prečne povezave. Prečne povezave nastajajo med lizinskimi ali hidroksilizinskimi preostanki na nezvijačenem karboksilnem ali amino koncu, imenovanem tudi telopeptid, in helikalnimi deli prilegajočega sosednjega kolagena. Ta proces tvori piridinolinske in deoksipiridinolinske prečne povezave v primarni strukturi mikrofibril iz molekul kolagena tipa I (Devlin, 1997).



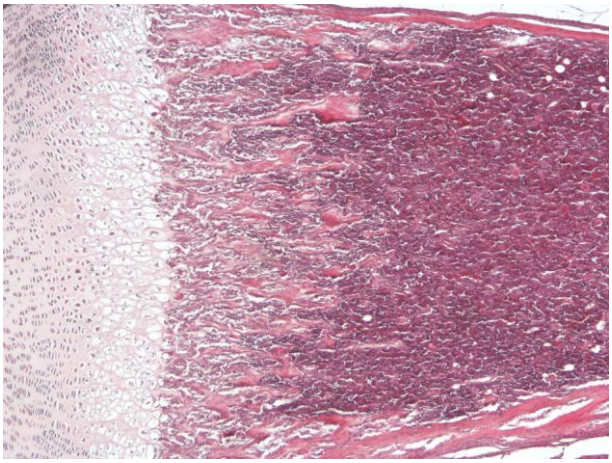
Shema 1: Zgradba molekule kolagena tip 1 (Devlin, 1997)

Od ostalih beljakovin sta pomembna še glikoprotein osteokalcin (kostni GLA-protein) in fosfoprotein osteonektin, ki pospešuje mineralizacijo.

Vloga proteoglikanov, ki tudi sestavljajo kosti, še ni popolnoma raziskana, ker pa imajo anionski značaj in zato veliko sposobnost vezave; verjetno tudi ti stimulirajo mineralizacijo.

Anorganski del kosti predstavlja 65% kostne mase in je predvsem iz kalcija in fosfatov. Magnezij, natrij, fluor, citrati in drugi elementi so v kosteh prisotni v majhnih količinah. Njihova vloga v presnovi kosti ni znana (Christenson, 1997).

V kosteh goveda je 99% vsega Ca v telesu, ki je vezan kot kalcijev fosfat. Kalcijev fosfat se v kosteh nahaja v dveh oblikah, in sicer kot amorfni kalcijev fosfat ($Ca_3(PO_4)_2$), v katerem je Ca labilno vezan in se stalno izmenjuje s Ca v telesnih tekočinah, ter stabilni kristalni hidroksiapatit ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) (Goff, 2004). Le okoli 0,1% celotnega Ca v kosteh je v obliki, ki je hitro dostopna in se lahko izmenjuje, kar pri odrasli kravi predstavlja 6 do 11 g Ca. Od izvencelične tekočine ga ločuje sincicij kostnih celic, vendar se lahko pod vplivom PTH hitro sprosti (Riond, 2001).

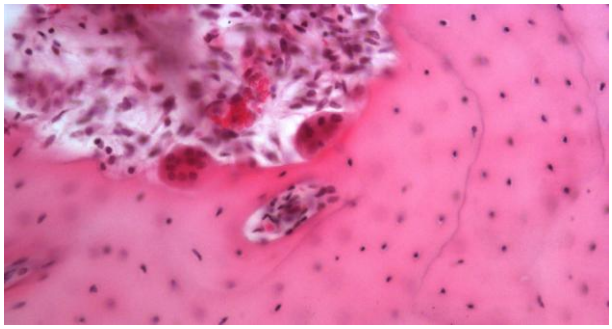


Fotografija 3: Vzdolžni prerez tibije podgane čez metafizo in del diafize; endohondralna osifikacija (HE, 40x), arhiv fotografij Jože Starič

2.1.2 CELICE, VKLJUČENE V METABOLIZEM KOSTI

Metabolizem kosti opravljata dva glavna tipa celic: osteoklasti in osteoblasti.

Osteoklasti so celice, ki vršijo razgradnjo kosti v BRU in so aktivni v zgodnjih fazah preoblikovanja. Vsak trenutek naj bi bili pri človeku aktivni na približno 1% površin kostnega tkiva. Nastajajo s fuzijo prekurzorskih celic, ki izvirajo iz hematopoetskih zarodnih celic (monocitno-makrofagne (mieloidne) linije) in nastajajo v kostnem mozgu. Zaradi tega so veliki ter praviloma večjedrni, z apikalnim in bazolateralnim polom, ki se razlikujeta po strukturi in funkciji. Tako fuzijo stimulirajo dejavniki, katerih vloga je indukcija resorpcije kostnine. Tako naj bi nanje posredno delovali 1,25-$(OH)_2D_3$ (Takeda in sod., 1999), paratiroidni hormon (PTH) (Liu in sod., 1998), neposredno pa RANKL preko receptorja RANK na osteoklastih in še nekateri citokini (Gallagher, 2008). Ugotovili so, da je za nastanek osteoklastov potrebna komunikacija med osteoblasti in celicami predhodnicami osteoklastov (Udagawa in sod., 1999).



Fotografija 4: Osteoklasta (pri levem lepo viden zalivček) med resorpcijo kostnega tkiva (razločiti se da osteon) (HE, 200x), arhiv fotografij Jože Starič

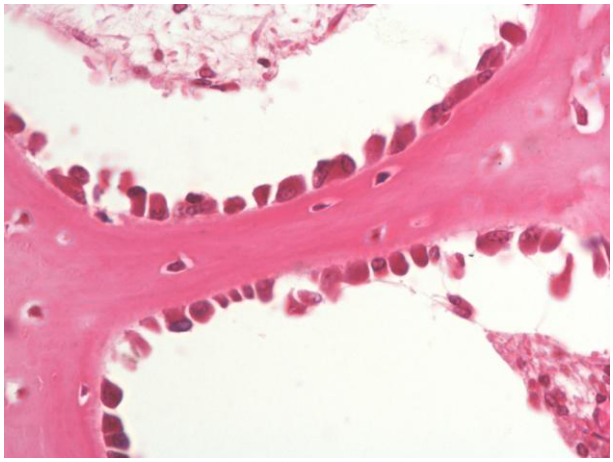
Na apikalnem polu osteoklasta je luknjičava (fenestrirana) celična membrana, ki je orientirana proti kostnemu matriksu in je mesto izločanja encimov in protonov, ki so potrebni za proces preoblikovanja. Bazolateralni pol osteoklasta je orientiran proti okolici kosti in ima vlogo pri fizioloških, regulacijskih in drugih celičnih funkcijah (tu so tudi receptorji za hormone in druge snovi). Osteoklastna aktivnost se vrši, ko se osteoklast z aktinom bogatimi podosomi na zunanjem robu svoje fenestrirane membrana prime mineraliziranega kostnega matriksa na površini kosti ter s tem izolira mikrookolje, imenovano tudi "zaprta cona". Zaprta cona je predel, kjer se vrši resorpcija kosti. Apikalna membrana osteoklasta se na tem predelu naguba, da ima čim večjo površino za sekrecijo. Osteoklasti vanjo izločajo HCl (za zniževanje pH), proteolitične encime, kot so tartrat rezistentna kisla fosfataza, aril-sulfataza, matriks metaloproteinaze, katepsine, beta glukuronidaze, cistein-proteinaze in beta-glicerofosfataze (Sato in sod., 2002). To povzroči razjedanje kosti in nastanek t. i. Howshipove lakune (Christenson, 1997). Okoliške celice pa hkrati ostanejo zaščitene pred negativnimi vplivi kisline in encimov.

Zadnje raziskave pa kažejo, da osteoklasti nimajo le funkcije resorpcije kostnega tkiva, ampak regulirajo tudi funkcijo osteoblastov, mediirajo izstop hematopoetskih zarodnih celic iz kostnega mozga v krvni obtok in delujejo kot imunomodulatorji na mestu patološkega procesa (Boyce in Xing, 2008).

V osteoblastno linijo celic sodijo stromalne celice, celice, ki obdajajo kosti, preosteoblasti, osteoblasti in osteociti. Izvirajo iz mezenhimskih zarodnih celic, ki se lahko diferencirajo tudi v fibroblaste, hondrocite, mioblaste in adipocite (Matsuo in Irie, 2008).

Osteoblasti so celice, ki tvorijo nemineraliziran kostni matriks in uravnavajo njegovo mineralizacijo. Osteoblasti se razvijejo iz mezenhimskih celic strome kostnega mozga.

Mehanizem diferenciacije osteoblastov iz pluripotentnih mezenhimskih celic še ni poplonoma razjasnjen. Ugotovili pa so vlogo PTH, vitamina D in še nekaterih faktorjev (npr. rastnih faktorjev - stimulirajo (Khan in sod., 2000), interferon α - zavira pri ljudeh (Oreffo in sod., 1998)) na njihov nastanek. Imajo eno jedro in dobro razvit grob endoplazmatski retikulum, ki je odgovoren za sintezo proteinov kostnega matriksa.



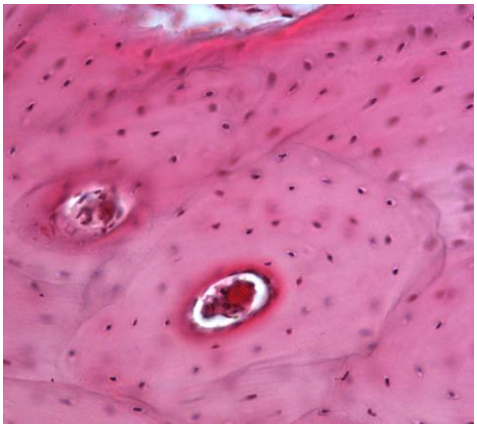
Fotografija 5: Osteoblasti (primarna osifikacija) (HE, 400x), arhiv fotografij Jože Starič

Pomembno vlogo pa imajo tudi pri nastanku in aktivnosti osteoklastov (z uravnavanjem sinteze osteoprotagerina (OPG) in aktivatorja receptorja liganda (RANKL), ki kompetitivno delujeta na receptor za jedrni faktor kappaB (RANK) osteoklastov) (Kanzawa in sod., 2000). Po delovanju osteoklastov in nastanku lakun, se vanje naselijo osteoblasti ter tam tvorijo nadomestni nemineraliziran kostni matriks ali osteoid. Osteoid zelo hitro po depoziciji mineralizira. Ko osteoblasti zapolnijo celotno lakuno BRU, se ustavi proces tvorbe kosti. Nekateri osteoblasti ostanejo ujeti v osteoid in se razvijejo v **osteocite**. Osteocite pogosto smatramo za metabolično neaktivne celice, vendar zgleda, da imajo pomembno funkcijo pri sprožitvi cikla preoblikovanja kosti. Odkrivali naj bi mikrofrakture, povečano napetost zaradi povečane obremenitve in druge nepravilnosti v kostni strukturi. Ko se vzdražijo naj bi signalizirali po mreži, ki jo tvorijo s svojimi dendritičnimi izrastki, ležečimi v kanalikulih, in vplivali na na površini kosti ležeče osteoblaste in mirujoče osteoblaste. Ti po tem začno producirati RANKL in na ta način tudi začetek cikla preoblikovanja kosti. Sami najverjetneje ne izražajo RANKL (Boyce in Xing, 2008). Pomembni naj bi bili tudi pri prenašanju dražljajev v notranjost kosti in po kosti, ker s svojimi dolgimi celičnimi izrastki tvorijo mrežo v notranjosti kosti (Christenson, 1997). Apoptotični osteociti naj bi tudi sproščali snovi, ki

močno stimulirajo preoblikovanje kostnega tkiva. Zato so nekateri mnenja, da naj bi vitalni v osnovi zavirali osteoklastno aktivnost (Matsuo in Irie, 2008). Nekateri naj bi omogočali tudi hitro sproščanje in resorpcijo Ca iz kosti oz. tekočine, ki obdaja osteocite, v procesu tako imenovane osteocitne osteolize, drugi pa so glede na svojo celično strukturo sposobni sintetiziranja osteoid (Christenson, 1997). Kalcij, raztopljen v tekočini, ki obdaja osteocite, ima podobno funkcijo pri ohranjanju normokalcemije kot glikogen pri uravnavanju normoglikemije. Pod vplivom PTH in kalcitriola lahko Ca sincicij osteocitov hitro prenese do izvencelične tekočine, od koder se absorbira v kri. Pri odrasli kravi je v tekočini, ki obdaja osteocite, približno 6 do 10 g Ca (Goff, 2000).

Mirujoče ploščate pluripotentne celice, ki obdajajo površine kosti, izvirajo iz osteoblastne linije (mezenhimske zarodne celice). Ne tvorijo kostnega tkiva. Pomembne so zaradi svoje sposobnosti, da aktivirajo osteoklaste oz. njihove prekurzorske celice. Med drugim izražajo tudi RANKL (Matsuo in Irie, 2008). Sposobne so se preobraziti v osteoblaste in sintetizirati kostni matriks. So del *Stratuma cambiuma* pokostnice ali periosta, ki obdaja kosti.

Poleg omenjenih celic naj bi imele vlogo pri preoblikovanju kostnega tkiva tudi endoteljne celice in živčne celice, ki proizvajajo snovi (npr. endotelijski rastni faktor, NO, neurotropini), s katerimi vplivajo na preoblikovanje kostnine (Matsuo in Irie, 2008).



Fotografija 6: Prečni prerez osteona, osnovne gradbene enote lamelarne kostnine. Vidni so osteociti med koncentrično razporejenimi lamelami kostnine okoli Haversovega kanala. Med sosednjima ostenonoma se vidijo cementne linije (HE, 200x). Arhiv fotografij Jože Starič

2.1.3 PREOBLIKOVANJA KOSTNEGA TKIVA

Preoblikovanje kosti poteka ciklično v več stopnjah, v BRU, ki se nahajajo na površini kosti in kostnih pregradah (Christenson, 1997; Swaminathan, 2001). Pri preoblikovanju kostnega tkiva, resorpciji kostninine z osteoklasti sledi sinteza nove kostnine, ki jo tvorijo osteoblasti, tako da se resorbirana lakuna zapolni do nivoja, enakega stanju pred začetkom resorpcije. Na leto se pri ljudeh zamenja približno 10% kostne mase, kar pomeni, da mora biti vsak trenutek pri človeku aktivnih v različnih fazah preoblikovanja več kot milijon BRU (Christenson, 1997). Od tega se vsako leto preoblikuje kar 25% trabelularne kostnine in le 2 - 3% kortikalne kostnine (Swaminathan, 2001). Vse faze preoblikovanja so med seboj povezane in koordinirane s hormoni in drugimi dejavniki. Najpomembnejši sistem za regulacijo preoblikovanja kosti je RANK Ligand/RANK/OSTEOPROTAGERIN, ki predstavlja največje odkritje na področju biologije okostja v zadnjem desetletju (Boyce in Xing, 2008; Gallager, 2008). Komunikacija med celicami, vključenimi v preoblikovnje kostnega tkiva, poteka preko direktnega kontakta med celicami, parakrino ter s pomočjo molekul, ki so v kostnem matriksu in jih celice med resorpcijo osvobodijo. Komunikacija med celicami, vključenimi v preoblikovanje kostnega tkiva, poteka v vsaki enoti kostnega metabolizma ločeno in neodvisno v različnih delih okostja (Matsuo in Irie, 2008).

Na **prvi stopnji**, aktivacija preoblikovanja, pride do razmaka mirujočih osteoblastov na površini kosti. Kostna površina se razgali, hkrati pa pride tudi do aktivacije prekurzorjev osteoklastov, njihove diferenciacije ter združevanja v večjedrne celice in aktivacije, ko se primejo mineralizirane kostnine in začnejo resorpcijo. Dokazali so, da osteoklasti prepoznajo površino kosti, zlasti kolagen in minerale ter le takrat tvorijo zaprto cono, in vitro, npr. na plastični površini ne pride ob aktivaciji do nastanka zaprte cone (Matsuo in Irie, 2008). Mehanizem, ki povzroči odmik mirujočih osteoblastov, še ni razjasnjen (Christenson, 1997). Nekateri so menja, da poteka osteoklastna aktivnost v tesnem stiku pod mirujočimi ploščatimi osteoblasti na površini kosti (Matsuo in Irie, 2008).

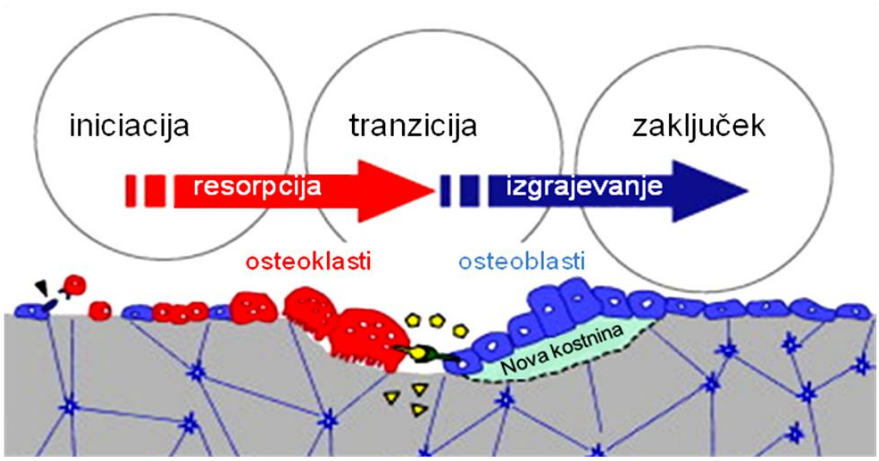
Na **drugi stopnji**, stopnja resorbcije, se začne osteoklastna aktivnost oz. kostna resorpcija. Nastajati začne lakuna BRU oz. Howshipova lakuna. Mehanizem ustavitve razgradnje kosti tudi še ni do popolnosti znan. Razgradnja lakune BRU se ustavi, ko doseže premer približno 100 mikrometrov in globino približno 50 mikrometrov. Proces resorpcije v BRU traja pri ljudeh približno tri tedne (Christenson, 1997).

Ko se konča resorpcija kosti, se začne **tretja stopnja**, v kateri se osteoklasti umaknejo iz lakune ter preidejo v fazo apoptoze. Ob tem se aktivirajo osteoblasti. Do aktivacije

najverjetneje prihaja na več načinov in sicer preko različnih faktorjev, ki se sprostijo iz resorbirane kostnine, faktorjev, ki jih izločajo osteoklasti in z direktnim kontaktom med osteoklasti in ostoblasti (Matsuo in Irie, 2008).

Na **četrti stopnji**, faza preobrata, pridejo v lakuno makrofagi, ki počistijo notranjost lakune in izgradijo tako imenovano cementno plast, ki zgladi površino lakune.

Cementna plast privablja v lakuno osteoblaste, ki začno sintetizirati osteoid, kar predstavlja **peto stopnjo** preoblikovanja, faza izgradnje (Christenson, 1997). Zgleda, da je diferenciacija osteoklastov v tem času inhibirana. Pri ljudeh traja ta stopnja približno tri mesece.



Shema 2: Proces preoblikovanja kostnega tkiva z vidika komunikacije med celicami Mirujči ploščati osteoblasti začno izražati RANKL (črna glava puščice), ki delujejo na receptorje RANK na hematopoetskih prekurzorjih osteoklastov, ki se zaradi tega aktivirajo, postanejo večjedrni in začnejo resorbirati kostnino. V fazi tranzicije pride do prehoda iz resorpcije v sintezo nove kostnine, kar mediirajo različni faktorji, npr. difuzijski (rumeni peterokotniki), molekule vezane na membrane (rumenkaste lizike na osteoklastih) in faktorji, ki se nahajajo v kostnini (rumeni trikotniki). V terminalni fazi se lakuna zapolni z novo kostnino, zreli osteoblasti izločajo OPG in inhibirajo nastanek osteoklastov. V kostnini (sive barve) se vidi osteocite povezane z mrežo kanalikulov, v katerih so njihovi dendritični izrastki (Matsuo in Irie, 2008).

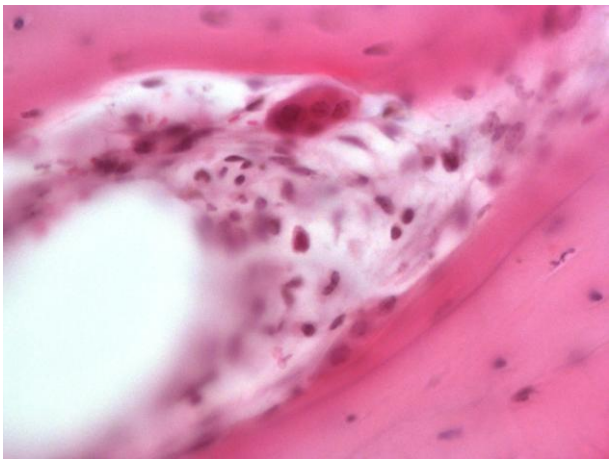
Na zadnji **šesti stopnji** preoblikovanja pride do mineralizacije osteoida. Osteoid mineralizira v 1 do 2 mesecih. Površino kosti ponovno prekrijejo neaktivni ploščati osteoblasti (Christenson, 1997). Pri ljudeh nekje v 6 do 9 mesecih osteoblasti ponovno zapolnijo lakuno z

novo kostnino, ki mineralizira (Gallager, 2008). Po tem se cikel preoblikovanja zaključi in ta del kosti preide v mirovanje. Za prehod osteoblastov v mirujoče stanje naj bi bili odgovorni osteociti, ki preko svojih izrastkov izločajo za to odgovoren faktor sklerostin. Zreli osteoblasti tudi v večji meri proizvajajo osteoprotagerin in tako preprečujejo razvoj osteoklastov in resorbcijo kostnega tkiva (Matsuo in Irie, 2008).

Resorpcija in sinteza kosti sta med seboj tesno povezani in lahko potekata le v tem zaporedju, kar pomeni, da sinteza brez predhodne resorpcije ni mogoča.

Do tretjega ali četrtega desetletja življenja pri človeku se kostna masa pri preoblikovanju povečuje, nato nekaj let stagnira, potem pa se začne manjšati. Ta masa naj bi se pri moških zmanjševala na račun zmanjšane sinteze osteoida osteoblastov, pri ženskah v postmenopavzalnem obdobju pa predvsem zaradi povečane aktivnosti osteoklastov (Christenson, 1997).

Tudi pri živalih se s starostjo zmanjšuje število aktivnih kostnih celic, zato je preoblikovanje kosti pri starejših živalih manj intenzivno kot pri mlajših (Goff, 2000).



Fotografija 7: Osteoklast in osteoblasti v Haversonovem kanalu med preoblikovanjem kosti – razgradnja in izgradnja kostnine potekata hkrati, spodaj se vidi bolj živo rdeč na novo izgrajeni osteoid pod osteoblasti, zgoraj je osteoklast, proti desnem zgornjem kotu fotografije gre Volkmanov kanal (HE, 400x). Arhiv fotografij Jože Starič

2.1.4 REGULACIJA METABOLIZMA KOSTI

Metabolizem kosti je vsestransko reguliran s številnimi sistemskimi in tkivnimi hormoni oz. faktorji. Do danes še ni popolnoma pojasnjeno, kaj vse sproža proces preoblikovanja kosti. Smatra se, da so to poškodbe delov kosti kot posledica obrabe, spremembe mehanske sile na okostje kot so povečana fizična aktivnost, povečana teža ter lokalno izločanje citokinov ali rastnih faktorjev, kot posledica spremenjene koncentracije sistemskih hormonov. Natančen molekularni mehanizem ter vloga, funkcija in mehanizem delovanja vseh hormonov in faktorjev, ki kontrolira iniciacijo, napredovanje in zaključek preoblikovanja se še vedno zelo intenzivno raziskuje. Do sedaj se že ve, da večina hormonov in faktorjev povzroči resorpcijo kostnega tkiva posredno preko sprožitve nastajanja RANKL, ki ga sintetizirajo osteoblasti in druge celice (Boyce in Xing, 2008). Najnovejše ugotovitve kažejo tudi na tesno povezanost imunskega sistema in metabolizma kostnega tkiva. Področje, ki preučuje to povezanost imenujemo osteoimunologija. Vedno več je dokazov, da imajo osteoklasti in imunske celice številne skupne regulacijske molekule, kot so citokini, receptorji, signalne molekule in transkripcijski faktorji, zato vplivajo drug na drugega. Razen tega je znano, da imunske celice izvirajo iz kostnega mozga in se tako z osteoklasti razvijajo v istem mikrookolju, kar dodatno povečuje verjetnost vplivov. Že dolgo nazaj je bilo odkrito, da antigensko stimulirane imunskih celic sintetizirajo topne faktorje, ki stimulirajo osteoklastno resorpcijo kostnega tkiva. Primer tega je revmatoidni artritis pri ljudeh, pri katerem ob vnetju prihaja tudi do resorpcije kostnega tkiva. Dokazano je bilo, da z blokado RANKL z OPG pri revmatoidnem artritisu signifikantno zmanjšajo destrukcijo kostnega tkiva v okolici artritičnega procesa. RANKL izražajo T in B limfociti in je pomemben tudi pri imunskem odgovoru (Nakashima in Takayanagi, 2008). Signaliziranje RANKL/RANK/NF-κB je nujno za razvoj bezgavk in dozorevanje limfocitov B (Boyce in Xing, 2008). Ugotovili so, da tudi lokalno ali sistemsko spremenjena koncentracija proinflamatornih citokinov stimulira resorpcijo kostnega tkiva (Nakashima in Takayanagi, 2008).

2.1.4.1 TKIVNI HORMONI OZ. FAKTORJI

- **RANKL** (aktivator receptorja jedrnega faktorja, kappa β ligand, staro ime zanj je bilo TRANCE) je beljakovina, ki je pritrjena na celično membrano mezenhimskih celic kot so osteoblasti, celice strome in sinovialne celice ter tudi limfocitov T. Od tu se lahko odcepi s pomočjo cepitve z matriks metaloproteazami (MMP 3, 7 ali 14) in postane

topna beljakovina. Sproža nastajanje osteoklastov iz prekurzorjev osteoklastov. Stimulira tudi izstopanje prekurzorjev osteoklastov iz kostnega mozga v krvni obtok, in deluje kemotaktično (Boyce in Xing, 2008). RANKL je tudi glavni faktor, ki aktivira osteoklaste ter tudi vpliva na dolgoživost osteoklastov nasproti apoptozi. Je najpomembnejši citokin vključen v zaključno stopnjo resorpcije kostnega tkiva. Ko so gen za RANKL izločili pri miših, je to povzročilo osteopetrozo, nastanek neormalnih bezgavk in nepravilno diferenciacijo limfocitov (Gallangher, 2008). Prekurzorji osteoklastov in osteoklasti imajo receptor za RANKL, ki se imenuje RANK.

Aktivira tudi dendritične celice imunskega sistema.

- **OPG (osteopratagerin)** proizvajajo poleg osteoblastov še številne druge celice (npr. v srcu, ledvicah, jetrih, vranici in limfociti B). B limfociti naj bi bili po nekaterih ugotovitvah odgovorni kar za 64% celokupnega OPG v kostnem mozgu zdravih miši (Boyce in Xing, 2008). OPG je glikoprotein, citokin iz skupine TNF receptorjev. OPG deluje kot blokatorski receptor in preprečuje delovanje RANKL, ko se veže nanj, ter tako preprečuje osteoklastogenezo. Kadar pride do pretirane ekspresije gena za OPG, to povzroči osteopetrozo, če pa gena za OPG pri miših ni bilo, je prišlo do hude osteoporoze (Gallangher, 2008).
- **Paratiroidnemu hormonu sorodna beljakovina (PTHrP)** ni strogo Ca regulirajoči hormon. Odkrili so ga leta 1982 kot osrednji faktor v patogenezi hiperkalcemije, pogojene s tumorji. Od takrat so ga začeli intenzivno preučevati in odkrili so, da ga proizvajajo številna tkiva (epitelijske celice kože in drugih organov, endokrine žleze, gladka, skeletna in srčna muskulatura, mlečna žleza med laktacijo, placenta, plodova obščitnica, kosti, možgani in limfocit), neodvisno od hiperkalcemije, pogojene s tumorji. Predvsem pri uravnavanju Ca metabolizma pri plodu naj bi imel posebej pomebno vlogo, saj je prav on odgovoren za vzdrževanje visokega nivoja Ca. Pri plodu ga izločajo glavne celice obščitnice in placenta, kjer stimulira prevzemanje Ca v plod. Pri odraslih ga proizvajajo številna tkiva, deluje pa kot parakrini celični regulator. Poseben pomen ima v mlečni žlezi, kjer uravnava transport Ca v mleko. Pri govedu je njegova koncentracija v mleku kar 10 do 100 tisočkrat večja kot v plazmi (Kaneko in sod., 1997).
- **Faktorji rasti fibroblastov** stimulirajo proliferacijo osteoblastov in sintezo kolagena v kosteh.

- **Insulinu podobni rastni faktorji ali somatomedini** povečujejo vsebnost proteinov v osteoidu s tem, da stimulirajo proosteoblastno proliferacijo, zavirajo razgradnjo kolagena in stimulirajo sintezo proteinov.
- **Transformirajoči rastni faktorji** naj bi bili pomembni pri dozorevanju celic kostnega tkiva, s tem da stimulirajo prekurzorske celice osteoblastov; stimulirajo sintezo alkalne fosfataze; eden naj bi bil tudi povezan s sintezo kolagena tipa I (Christenson, 1997), faktor β pa naj bi pri miših zaviral rast kosti (Serra in sod., 1999).
- **Trombocitni rastni faktor**, ki se nahaja v kostnem matriksu, stimulira izvorne celice osteoblastov in sintezo proteinov.
- **Prostaglandini** tako osteoblasti kot osteoklasti se odzivajo na različne prostaglandine, ki lahko uravnavajo njihov odgovor na druge rastne faktorje. Prostaglandin E_2 stimulira mezenhimalne zarodne celice, da se začno diferencirati v osteoblaste (Scutt in Bertram, 1995). Ob vnetju in prisotnosti endotoksina imajo prostaglandini lahko podoben učinek kot kalcitonin – zmanjšujejo nivo krvnega kalcija in fosfatov pri kravah (Waldron in sod., 2003).
- **Tkivni nekrozni faktor** stimulira sintezo kolagena v preosteoblastih in verjetno tudi zavira sintezo kolagena v bolj zrelih celicah.
- **Tumorski nekrozni faktor (TNF-α)** poleg indukcije lokalnega vnetja tudi spodbuja nastajanje osteoklastov z združitvijo prekurzorjev osteoklastov in nastjanje prekurzorjev osteoklastov v kostnem mozgu, njihov izstop v krvni obtok in izstopanje iz krvi v okolico vnetega sklepa preko stimulacije izražanja RANKL in tudi direktno (Boyce in Xing, 2008; Zwerina in sod., 2005). Pri miših ima tudi negativni učinek na nastajanje kostnine, ker moti diferenciacijo in metabolično aktivnost osteoblastov (Zwerina in sod., 2005).
- **Kolonije stimulirajoči faktor** je vključen pri proliferaciji osteoklastov in verjetno je vključen tudi v mehanizme signaliziranja med osteoklasti in osteoblasti.
- **Interlevkini** vplivajo na tvorbo in resorpcijo kosti, npr. IL 1, IL 6, IL 11, IL 17 lahko sprožijo nastajanje osteoklastov iz prekurzorjev preko stimulacije izražanja RANKL (Nakashima in Takayanagi, 2008), IL 6, npr. pri kravah sproščajo osteoblasti ob stimulaciji s PTH in tako stimulirajo osteolizo (Goff in sod., 1991).
- **Kostni morfogenetični protein** stimulira tvorbo kosti.
- **Interferon gama** zavira resorpcijo kosti (Christenson, 1997).

Obstajajo pa še številni drugi faktorji, ki vplivajo na izgrajevanje in razgrajevanje kostnine. Večina raziskav na tem področju se izvaja s pomočjo knock-out miši, pri katerih

je onemogočen nastanek specifičnih beljakovin in s tem tudi delovanje na te beljakovine vezanih procesov.

2.1.4.2 SISTEMSKI HORMONI

- **Paratiroidni hormon (PTH)** ali parathormon stimulira preoblikovanje kostnega tkiva, tako da deluje na mirujoče osteoblaste, kar povzroča povečano izražanje RANKL ter s tem posredno povečano aktivnost osteoklastov in aktivacijo BRU (preko osteoblastov stimulira resorpcijo kostnine) (Rattanakul in sod., 2003; Nakashima in Takayanagi, 2008). Stimulira tudi osteocitno osteolizo. Pospešuje delovanje osteoblastov. PTH tudi zvišuje 1 α hidrokilazno aktivnost in tako nastajanje kalcitriola. Stimulira resorpcijo Ca skozi ledvice, ob čemer se izloča fosfat (Goff, 2000). Pri kravah je potrebnih približno 48 ur, da se začne kostna resorpcija po stimulaciji s PTH (Horst in sod., 1994). S tem zvišuje koncentracijo Ca v krvi, kar je njegova primarna vloga. Ker zahteva uravnavanje nivoja Ca v krvi zelo natančno regulacijo, se PTH po stimulaciji začne zelo hitro izločati, njegova razpolovna doba pa je krajša od 5 minut. V določenih okoliščinah ima potencialno tudi anabolični učinek na okostje pri miših (Goltzman, 2008).
- **Trijodtironin (T3)** stimulira preoblikovanje kostnega tkiva. Deluje na osteoklaste in osteoblaste, stimulira njihovo delovanje in nastajanje kostnine. Pomanjkanje povzroči motnje v osifikaciji (Christenson, 1997).
- **Estrogen in testosteron** pospešujeta tvorbo in zavirata resorpcijo kostnega tkiva. Delujeta na osteoblaste (Christenson, 1997). Pri ljudeh sta pomembna pri vzdrževanju kostne mase (Rickard in sod., 1999). Estrogeni naj bi tudi pozitivno delovali na Ca kanalčke v enterocitih in tako stimulirali absorpcijo Ca iz krme (Hoenderop in sod., 2003).
- **Vitamin D_3**, njegova aktivna oblika **kalcitriol,** pospešuje preoblikovanje kostnega tkiva tako, da deluje na rast kostnine, dozorevanje osteoblastov in mineralizacijo osteoida. Pri pomanjkanju vit. D_3 pride do povečane aktivacije BRU in inhibicije mineralizacije osteoida (Christenson, 1997, Yamagishi in sod., 2005). Receptorje za kalcitriol imajo osteoblasti, ki pa lahko preko celičnega signaliziranja s povečanim izražanjem RANKL aktivirajo tudi osteoklaste in resorpcijo kostnega tkiva (Gallagher, 2008). Glej posebno poglavje o vitaminu D na strani 68.

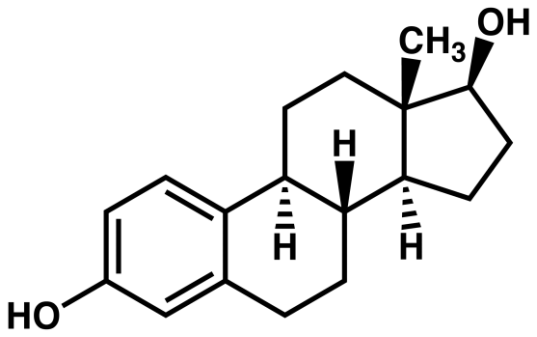
- **Glukokortikoidi** v povišani koncentraciji skozi daljše obdobje delujejo stimulirajoče na resorpcijo kostnega tkiva in zavirajoče na sintezo kostnega tkiva. Poruši se razmerje med RANKL/OPG v korist RANKL. Zmanjšujejo razvoj osteoblastov iz prosteoblastov in stimulirajo apoptozo osteoocitov in osteoblastov (Weinstein in sod., 1998). Kratkotrajna terapija z glukokortkoidi pa naj bi stimulirala sintezo kolagena tipa 1 (Christenson, 1997). Pri podganah naj bi imel v določenih okoliščinah kalcitoninu podoben učinek, in sicer zniževanje nivoja krvnega Ca, posebej med hiperkalcemijo (Hirsch in sod., 1998). Do tega učinka naj bi prišlo preko prostaglandinov.
- **Kalcitonin** je polipeptidni hormon, ki ga izločajo C-celice ščitnice, zmanjšuje resorpcijo kostnega tkiva s tem, da zavira diferenciacijo prekurzorjev osteoklastov in delovanje osteoklastov. Na tvorbo kostnega tkiva ne vpliva, zato lahko rečemo, da le zmanjšuje kostni metabolizm (Christenson, 1997).
- **Insulin** stimulira sintezo insulinu podobnega rastnega faktorja v jetrih, ki stimulira sintezo kolagena pri osteoblastih (Christenson, 1997).
- **Prolaktin** – povišana koncentracija prolaktina zavira sintezo estrogena in testosterona ter tako sekundarno povzroča izgubljanje kostne mase (Christenson, 1997).
- **Rastni hormon** stimulira tvorbo kostnega tkiva s tem, da stimulira proliferacijo osteoblastov in sintezo proteinov ter zavira razgradnjo kolagena. Na resorpcijo pa ne vpliva (Christenson, 1997).

2.1.4.3 ESTROGENI

Estradiol je steroidni ženski spolni hormon, ki ima molekulsko maso 272,39 daltonov. Nastaja primarno v folikularnih celicah v jajčnikih. Njegovo nastajanje v jajčnikih stimulirata hipofizna hormona folikel stimulirajoči hormon (FSH) in luteinizirajoči hormon (LH). Med brejostjo je placenta glavni vir estrogenov (Patel in sod., 1999). Estrogeni so potrebni za vzdrževanje brejosti, povezali so jih tudi z rastjo in razvojem ploda (Mendelson in sod., 1980), kasneje pa tu z sprožitvijo začetka poroda. Študije pri številnih živalskih vrstah kažejo na naraščanje estrogenov z napredovalo brejostjo ter dosegom viška koncentracije ob porodu (Patel in sod., 1999).

Estradiol prosto prehaja v celice. Receptorji za estradiol so intracelularno v citoplazmi. Mehanizem delovanja estradiola je enak kot pri ostalih steroidnih hormonih. Po vezavi z

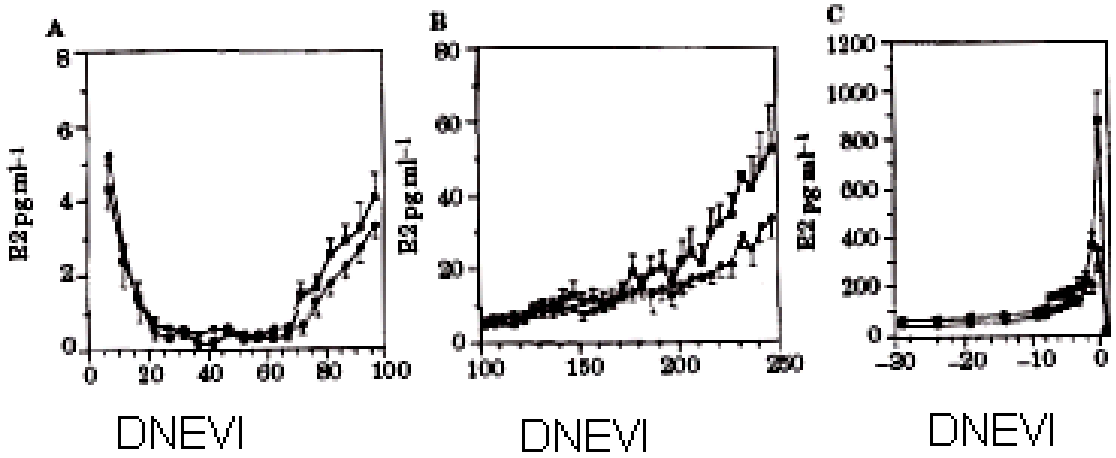
ligandom gredo v jedro, kjer uravnavajo transkripcijo genov ter nastanek mRNA. Končni učinek je nastanek beljakovin.



Shema 3: 17-β-Estradiol (Vir: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Estradiol2.png)

Gibanje med presušitvijo in laktacijo pri kravah

Od ovulacije do poroda se koncentracija estrogena statistično značilno spreminja. Ob ovulaciji je njegova koncentracija v plazmi dokaj visoka, okoli 5 pg/mL. Po tem se začne koncentracija zniževati do okoli 20. dne (< 1 pg/mL) in ostane na tem nivoju nekje do 60. dneva po ovulaciji oz. brejosti, na kar se začne postopoma poviševati. Okoli sredine brejosti koncentracija doseže > 7 krat višje vrednosti od tistih do 60. dneva. Postopno višanje koncentracije se nadaljuje vse do zadnjega dneva pred porodom, ko se vrednost do poroda podvoji (349,2 ± 87,4 pg/mL). Prvi dan po porodu se vrednost estrogena zopet povrne na bazalno vrednost (Patel in sod., 1999).



Grafikon 1: Gibanje estradiola (E2) od obrejitvije do poroda pri Holštajn frizijskem govedu po in vitro fertilizaciji in embrio transferu; s krogi je označeno gibanje pri kravah z enim plodom, s kvadrati pa pri kravah, ki nosijo dvojčke (po Patel in sod., 1999).

Vpliv estradiola na metabolizem kostnega tkiva

Estrogen je močen inhibitor resorpcije kostnega tkiva (Manolagas in sod., 1993), stimulira pa osteoblaste in nastajanje kostnega tkiva (Christenson, 1997). Estrogen izraža svoj inhibitorni učinek na resorpcijo kostnega tkiva preko stimulacije nastajanja OPG v osteoblastih. Kadar je estrogena malo, pri ženskah v menopavzi, se poruši razmerje med RANKL /OPG v korist RANKL, kar ima za posledico izgubo kostnine (Gallager, 2008). Goff (2000b) predvideva, da visok nivo estrogena ob porodu krav znižuje sposobnost mobilizacije Ca iz okostja v tem obdobju, vendar pa naj ne bi predstavljal pomembnega dejavnika tveganja za nastanek obporodne hipokalcemične pareze. Pri ovrioektomiziranih ovcah so ugotovili signifikantno znižanje estradiola po posegu, kazalci metabolizma kosti pa so se povišali, tako tisti za sintezo, kot tudi razgradnjo, vendar pa je bil končni učinek na kostnino osteopeničen. Šest mesecev po posegu so se vse vrednosti, tudi estradiola, vrnile v meje, ki so bile pred posegom (Sigrist in sod., 2007).

Visoka koncentracija estrogena ob porodu naj bi bila eden od dejavnikov, ki negativno vpliva na konzumacijo krme v tem obdobju (Grummer in sod., 2004). Zmanjšano uživanje krme ima za posledico znižan vnos Ca in večjo nagnjenost k hipokalcemiji.

2.1.5 UGOTAVLJANJE METABOLIČNEGA STATUSA KOSTI

Metabolizem kostnega tkiva je zelo aktiven v celotnem okostju, zato vsaka motnja nastajanja kostnine ali neskladje med razgrajevanjem in sintezo, zaradi kateregakoli razloga, v določenem časovnem obdobju poslabša kvaliteto kosti.

Za diagnosticiranje bolezni okostja in spremljanje metabolizma kosti obstaja več metod, ki dajejo pomembne informacije o njegovem stanju. Ločimo invazivne in neinvazivne diagnostične metode. Invazivne metode temeljijo na jemanju biopsatov kostnega tkiva, ki jim sledi kemična, histološka ali imunokemična preiskava biopsata. Z neinvazivnimi metodami pa lahko vizualiziramo kostno tkivo s pomočjo tehnik na osnovi rentgenskih žarkov ali magnetne resonance ali pa ugotavljamo produkte izgradnje in razgradnje kostnine v telesnih tekočinah ter tako ugotavljamo metabolično aktivnost okostja.

Merjenje biokemičnih kazalcev metabolizma kosti sodi med neinvazivne diagnostične metode. Njihova prednost pred ostalimi metodami je, da z njimi ocenimo razgrajevanje, izgrajevnje in preoblikovanje v času, ko vzamemo vzorce krvi ali urina, v katerih jih merimo (Delmas, 1993). Zelo dobro so se izkazali pri spremljanju stanja kostnega metabolizma v nekem časovnem obdobju in pri ocenah trenda kostnega metabolizma. Kljub temu, da

nekatere biokemijske preiskave za ocenjevanje stanje okostja že dolgo preučujejo, predstavljajo biokemijski kazalci metabolizma kosti relativno nov in šele razvijajoči diagnostični pripomoček v veterinarski klinični patologiji (Allen, 2003).

2.2 BIOKEMIJSKI KAZALCI METABOLIZMA KOSTI

Pri izgrajevanju in razgradnji kostnega tkiva med aktivnostjo osteoblastov ali osteoklastov nastajajo specifični presnovni produkti, ki prehajajo iz okostja v kri, nekateri pa v spremenjeni ali nespremenjeni obliki tudi v urin. Pri izrazito povečani izgradnji ali razgradnji kosti se raven teh produktov v krvi ali urinu poveča. Stanje kazalcev metabolizma kosti kaže na spremembe v mineralni kostni gostoti. Uporabljamo jih predvsem za ocenjevanje stanja razgradnje in izgrajevanja (oz. metabolizma) kosti neposredno v času odvzema vzorcev krvi ali urina (Christenson, 1997). Kadar poteka proces povečane sinteze ali resorpcije kosti manj intenzivno, se sprememb v krvnih ali urinskih kazalcih metabolizma kosti ne da ugotoviti.
Večina biokemijskih kazalcev so stranski produkt sinteze kolagena tipa I ali njegovi razgradni produkti. Drugi kazalci metabolizma kosti so še encimi, ki so potrebni v procesu preoblikovanja kosti ali prekomerno sintetizirane kostne beljakovine (Delmas, 1993).
Kazalce metabolizma kosti delimo na:

1. biokemijske kazalce izgrajevnja kostnine,
2. biokemijske kazalce razgrajevanja kostnine.

2.2.1 BIOKEMIJSKI KAZALCI IZGRAJEVANJA KOSTNINE

Biokemijski kazalci izgrajevanja kostnine so produkti aktivnosti osteoblastov, celic, ki izgrajujejo kostno tkivo.

2.2.1.1 CELOKUPNA ALKALNA FOSFATAZA (ALP)

Skupno serumsko ALP predstavlja skupina izoencimov, ki izvirajo iz jeter, kosti, ledvic, črevesja in placente. Sodijo med hidrolaze, ki v akalnem okolju odcepljajo fosfatno skupino od različnih vrst molekul (defosforilirajo) (Swaminathan, 2001).
Ledvični, jetrni, kostni in zgodnje placentni izoencim ALP naj bi kodiral en gen, zato so razlike v sestavi med njimi zelo majhne in rezultat posttranslacijskega procesiranja. Črevesni

izoencim je kodiran na posebnem genu. Pri ljudeh so ugotovili, da jih kodirajo celo 4 geni, kar pa ni dokazano pri živalih. ALP je metaloencim, ki je vključen v celične membrane. Ledvičnega izoencima naj ne bi bilo v krvnem serumu (Kaneko in sod., 1997). V mladosti naj bi v serumu prevladoval kostni izoencim, po zaprtju epifiznih rastnih ploščic v odraslem obdobju pa jetrni. Ostali izoencimi naj ne bi bistveno doprinesli k skupni ALP. Povišane vrednosti ALP pri govedu so prisotne pri hepatitisu, boleznih biliarnega trakta ter med rastjo telesa zaradi aktivnega kostnega metabolizma (Sato in sod., 2005). Pri obolenjih skeleta prevladuje v krvi kostni izoencim. Glede na druge jetrne teste in klinična znamenja bolezni kosti se da povišanje skupne ALP pripisati obolenju kosti (Allen, 2003). Ker je v mleku veliko ALP, naj bi bi na celokupno ALP imela vpliv tudi laktacija (Sato in sod., 2005).

2.2.1.2 KOSTNO SPECIFIČNA ALKALNA FOSFATAZA (bALP)

Danes se določa kostno specifični izoencim ALP tudi pri živalih (Rude in sod., 2004, Sato in sod., 2002, Kurosaki in sod., 2007a). To je membranski ektoencim osteoblastov, ki naj bi imel vlogo pri prenosu snovi iz celice v izvencelični prostor, tudi fosfatov pri sintezi kostnine (Christenson, 1997). bALP naj bi zavirala zaviralce za deponiranje kalcijevega fosfata (Bikle, 1997; Christenson, 1997). Po določenem času se bALP odcepi od celične membrane in preide v medceličnino in kri (Christenson, 1997), od koder jo prevzemajo jetra in jo razgrajujejo. Razpolovna doba bALP je pri ljudeh nekaj ur do 7 dni in vivo (Delmas, 1993). Njegovo določanje je zaradi podobnosti z drugimi izoencimi težavno. Pri povečani sintezi kosti nastaja v zelo velikih količinah in je zato odličen pokazatelj povečane sinteze kosti v organizmu. Pri konjih so najvišje vrednosti izmerili pri rastočih živalih, pri odraslih pa se je njena aktivnost močno zmanjšala (Lepage in sod., 2001).

bALP se določa v serumu. Med različnimi metodami določanja so najbolj občutljive in specifične imunokemične metode merjenja aktivnosti bALP, pri čemer za določene živalske vrste lahko uporabljamo humane analizne komplete (Allen, 2003).

2.2.1.3 OSTEOKALCIN (OCN)

Sestavljen je iz 46 – 50 amino kislin in je glavni nekolagenski del organskega kostnega matriksa in dentina. Njegova molekulska masa je 5800 daltonov. Sintetizirajo ga zreli osteoblasti in odontoblasti pod kontrolo kalcitriola (Swaminathan, 2001).

V njegovi kemijski strukturi je pomemben Ca vezujoči ostanek glutaminske kisline, γ-karboksiglutaminska kislina (Gla), ki nastaja posttranslacijsko s karboksilacijo, pri kateri je potreben vit. K (Bikle, 1997; Christenson, 1997). Zato ga imenujemo tudi kostni Gla protein (Allen, 2003). Stara imena za ostekalcin so še od vitamin K odvisna beljakovina in kostna gama karboksiglutaminsko kislinska beljakovina (Lepage in sod., 2001). Ta ga tudi veže na hidroksiapatit. Ugotovili so, da deluje tudi kemotaktično na osteoblaste in da je odgovoren za normalno mineralizacijo kolagena. Njegovo natančno funkcijo in mehanizem delovanja še preučujejo (Christenson, 1997).

Večina se ga vgradi v kosti, nekaj malega pa preide v kri, kjer ga začnejo razgrajevati serumske proteaze. Razgradni produkti se izločajo z jetri in ledvicami, njegova razpolovna doba pa je le 60 – 70 minut. Tudi in vitro v vzorcih se hitro razgrajuje naprej (Allen, 2003).

Fragmenti OCN se izločajo v kri tudi pri resorpciji kosti in ga zato lahko uporabljamo tudi pri ocenjevanju povezanosti sinteze in resorpcije ter tako kostnega preoblikovanja. Če ni povezan z resorpcijo kosti, pa predstavlja povečano osteoblastično aktivnost (Bikle, 1997; Allen, 2003).

Tudi za ugotavljanje OCN obstaja več testov, večinoma imunokemijskih (Allen, 2003). Protitelesa za ugotavljanje OCN navzkrižno reagirajo med živalskimi vrstami (Kaneko in sod., 1997).

2.2.1.4 PROPEPTIDI PROKOLAGENA TIPA 1

Kolagen, glavni produkt sinteze osteoblastov, nastaja iz prokolagena, potem ko se od prokolagena v izvenceličnem prostoru encimatsko odcepijo karboksiterminalni (P1CP) in aminoterminalni (P1NP) propeptidi (Christenson, 1997). Od tu prehajata v kostni matriks in tudi v kri. Koncentracija P1CP in P1NP v serumu naj bi kazala na stopnjo sinteze kolagena tipa 1 (Allen, 2003). Molekulska masa P1CP je okoli 100000 daltonov, P1NP pa okoli 35000 daltonov. Oba propeptida se razgrajujeta v jetrih in imata kratek razpolovni čas in vivo (Swaminathan, 2001). P1NP se delno še porablja za sintezo novega kolagena, zato je kot kazalec kostnega metabolizma manj primeren. Serumski P1CP pri galopskih konjih korelira z bALP in ALP (Allen, 2003).

V krvnem serumu živali se ugotavljata z imunokemijskimi metodami (Allen, 2003). In vitro sta zelo stabilni molekuli. Pri konjih so ugotovili cirkadiano nihanje koncentracije obeh propeptidov (Jackson in sod., 2003). Zaradi nihanja koncentracije v krvnem serumu in slabe

občutljivosti testa se jih redko uporablja za ocenjevanje kostnega metabolizma (Christenson, 1997).

2.2.1.5 KOSTNI SIALOPROTEIN (BSP)

BSP je glikoziliran fosfoprotein, ki ga sintetizirajo osteoblasti. Vlogo naj bi imel pri mineralizaciji kosti. Njegovo povišanje so odkrili pri ljudeh z boleznimi metabolizma kosti tako, da je njegova količina v krvnem serumu bolj povezana z resorpcijo kostnine kot s sintezo, razlage za to pa še ni. Ugotavljamo ga z imunokemijskimi metodami (Swaminathan, 2001).

2.2.2 BIOKEMIJSKI KAZALCI RAZGRAJEVANJA KOSTNINE

Biokemijski kazalci razgrajevanja kostnine so produkti osteoklastne aktivnosti. Vsi razen tartrat rezistentne kisle fosfataze so razgradni produkti kolagena.

2.2.2.1 TARTRAT REZISTENTNA KISLA FOSFATAZA (TRAP)

Do sedaj so pri ljudeh in živalih odkrili vsaj 6 izoencimov kisle fosfataze, in sicer osteoklastna, prostatična, makrofagna, trombocitna, eritrocitna in vranična (Swaminathan, 2001; Igarashi in sod., 2002). Med sabo se jih da ločiti s pomočjo inhibicije s tartratom, kar praktično pomeni, da se vzorcem pred merjenjem aktivnosti kisle fosfataze doda L tartrat in po tem izmeri aktivnost (Igarashi in sod., 2002).

Kostno kislo fosfatazo, ki je tartrat rezistentna (TRAP), izločajo z lizosomi osteoklasti v veliki koncentraciji v zaprto cono, kjer se vrši resorpcija kosti (Christenson, 1997). Izločanje TRAP naj bi inducirala tudi PTH in vitamin D_3 (Minkin, 1982). V kri naj bi prišla na dva načina in sicer transcelularno iz zaprte cone in po odstranitvi osteoklasta od razkrojene kosti (Christenson, 1997).

Ugotavljamo jo z elektroforezo, kromatografijo in kolorimetrično v serumu ali plazmi. Sedaj obstajajo tudi imunokemične metode za določevanje TRAP.

Novejše študije kažejo, da je TRAP zelo dober kazalec razgradnje kostnine pri človeku (Igarashi in sod., 2002).

2.2.2.2 HIDROKIPROLIN (HYP)

HYP predstavlja največji delež aminokislin v kolagenu I, kar 13% vseh aminokislin. Nastaja postranslacijsko v peptidni verigi (Swaminathan, 2001). Sprošča se pri osteoklastni aktivnosti, ko se kolagen razgrajuje in se ne more ponovno uporabiti pri sintezi (Swaminathan, 2001). Prisoten je tudi v P1NP (kazalec sinteze kosti). Osemdeset % HYP presnovijo jetra v ureo in CO_2, 10% pa ga gre nespremenjenega, vgrajenega v kratke peptidne verige, v urin (Christenson, 1997).

Ta kazalec ni specifičen za kostni kolagen, saj ga veliko najdemo tudi v kolagenu drugje v telesu. Ker HYP ni specifičen le za kolagen I, ga je veliko tudi v hrani, še posebej v tisti, ki vsebuje želatino. Zato lahko prehrana močno vpliva na njegovo koncentracijo v vzorcih. Nahaja se tudi v C1q komponenti komplementa, zato je ob vnetnih procesih v organizmu lahko močno povišan (Swaminathan, 2001).

Meri se spektrofotometrično in s pomočjo HPLC. Zaradi zahtevnega postopka ugotavljanja in slabe specifičnosti se redko uporablja (Allen, 2003). Pri interpretaciji tega kazalca je potrebno upoštevati našteta dejstva. Znižana vrednost HYP v urinu pa vsekakor izključuje povečan metabolizem kosti (Bikle, 1997).

2.2.2.3 HIDROKSILIZIN

Hidroksilizin je še ena aminokislina, ki je značilna za kolagen in se po njegovi razgradnji ne uporabi, ampak izloči. Je manj razširjena od HYP. V kolagenu se nahaja v dveh oblikah in sicer kot galaktozil hidroksilizin (GHYL) in glukozil-galaktozil-hidroksilizin (GGHYL) (Swaminathan, 2001). GHYL je značilen za kostni kolagen. Sprošča se le pri razgradnji kolagena 1 in ne pri sintezi. Naj bi bil bolj občutljiv kazalec od HYP (Kaneko in sod., 1997). Prehrana ne vpliva na njegovo koncentracijo v urinu. Zanj je značilna velika biološka variabilnost, razen tega pa so testi za njegovo ugotavljanje zahtevni (Swaminathan, 2001).

2.2.2.4 PIRIDINOLINSKE (Pyd) IN DEOKSIPIRIDINOLINSKE (Dpd) PREČNE POVEZAVE KOLAGENA

Pyd in Dpd sta posttranslacijsko spremenjena lizinska in hidroksilizinska aminokislinska ostanka, ki stabilizirata in utrjujeta zrela kolagenska vlakna, s tem da tvorita prečne povezave

med telopeptidom in helikalno regijo kolagenskih molekul. To povzroča stabilnost in elastičnost kolagenske strukture (Christenson, 1997; Swaminathan, 2001).

Pyd je prisoten v kostnem in hrustančnem matriksu ter v zelo majhnih količinah tudi v drugem vezivnem tkivu. Pomembne količine Dpd pa najdemo le v kostnem tkivu. Zaradi metabolične aktivnost kosti sta večinoma kostnega izvora (Swaminathan, 2001).

Oba se sproščata pri resorpciji kostnega matriksa in se v telesu ne presnavljata (Christenson, 1997). Izločata se z urinom (Swaminathan, 2001). Njuna količina v urinu ni odvisna od prehrane in nista podvržena nobenemu presnavljanju ter se tudi ponovno ne uporabljata pri sintezi kolagena. Pri živalih lahko Pyd merimo v krvi ali urinu, Dpd pa le v urinu (Allen, 2003). Petdeset do 60% je vezanih na N-terminalni in C-terminalni teleopeptid, ostalo pa so nevezane (le prečne povezave) (Christenson, 1997). Zgleda, da Pyd nastaja šele po presnovi teleopeptidov v jetrih ali ledvicah. Če hočemo ugotavljati skupnega, moramo telopeptide najprej hidrolizirati. Izločanje obeh ima dnevno-nočni ritem, z viškom izločanja zgodaj zjutraj in najnižjim izločanjem zvečer (Allen, 2003). Ugotavlja se s HPLC, v novejšem času pa tudi z imunokemijskmi test (RIA, ELISA) (Allen, 2003).

2.2.2.5 PREČNE POVEZAVE KOLAGENA I VEZANE NA TELOPEPTIDE

Prečne povezave kolagena I, vezane na telopeptide, nastajajo pri razgradnji kolagena 1 na N in C koncu ob delovanju kislih fosfataz iz osteoklastov (Allen, 2003.) Ker je večina teh fragmentov zelo majhnih, nespremenjeni prehajajo v urin, nekaj pa se jih razgradi v jetrih in ledvicah (Christenson, 1997).

2.2.2.5.1 PREČNE POVEZAVE KOLAGENA I VEZANE NA N-TERMINALNE TELOPEPTIDE (NTx)

NTx nastajajo pri razgradnji kolagena I, na N terminalnem koncu. NTx je specifičen za razgradnjo kolagena I v kosteh, v drugih tkivih se kolagen I drugače razgrajuje (Christenson, 1997). Ugotavljajo ga v urinu in krvi. Testi temeljijo na imunokemijskih metodah (Allen, 2003).

2.2.2.5.2 PREČNE POVEZAVE KOLAGENA I VEZANE NA C-TERMINALNE TELOPEPTIDE (CTx IN ICTP)

CTx se sproščajo v kri pri osteoklastni aktivnosti med resorpcijo kosti in razgradnjo kolagena I na C terminalnem koncu (Bikle, 1997). Za njihov nastanek je nujno delovanje osteoklastov, ki so prisotni le v kosteh. Ne uporablja se pri drugih metaboličnih procesih, ampak se nespremenjen izloča v urin. Koncentracija CTx pri številnih neprežvekovalcih niha cirkadiano, najvišja je zgodaj zjutraj (Allen, 2003). Ekelund (2003) pa pri treh preučevanih kravah ni ugotovil nobenega dnevnega vzorca nihanja vrednosti CTx.

Ugotavljajo ga v urinu in krvnem serumu. Testi temeljijo na imunokemijski detekciji (RIA, ELISA) specifičnih sekvenc na C terminalnem koncu, ki so skupne vsem CTx (Christenson, 1997). Test je že tudi avtomatiziran.

ICTP je zelo podoben CTx, le proteaza za ICTP je nekoliko drugačna in test deluje na drug epitop kot pri CTx. Je kostno specifična molekula. Njegova molekulska masa je 12000 daltonov. Izloča se skozi ledvice (Eriksen in sod., 1993). Merimo ga le v serumu živali (Allen, 2003). Testi temeljijo na imunokemičnem ugotavljanju (ELISA, RIA) (Bikle, 1997; Allen, 2003). ICTP naj bi bil posebej občutljiv pri ugotavljanju kostnih metastaz pri človeku (Swaminathan, 2001).

2.2.3 ODVZEM IN SHRANJEVANJE VZORCEV KRVI IN URINA ZA PREISKAVO NA KAZALCE KOSTNEGA METABOLIZMA

Vzorce krvni jemljemo v epruvete brez dodanih antikoagulantov. Pustimo jih spontano koagulirati. Po dvakratnem centrifugiranju (na 3000 obratih na minuto po 10 minut) pridobljeni krvni serum shranjujemo na temperaturi –20 ºC ali nižji. Za določevanje OCN je potrebno vzorce v eni uri po odvzemu zamrzniti, ker je OCN pri sobni temperaturi nestabilen. V ustrezno zamrznjenih vzorcih krvnega seruma so obstojni vsaj 6 mesecev.

Vzorce urina shranjujemo do preiskave v plastične ali steklene posode brez dodatkov, na temperaturi –20 ºC (Allen, 2003).

2.2.4 VREDNOTENJE IN INTERPRETACIJA VREDNOSTI KAZALCEV KOSTNEGA METABOLIZMA

Kazalci kostnega metabolizma kažejo na spremembe v mineralni gostoti kosti, zato jih uporabljamo za ocenjevanje resorpcije in sinteze kostnega tkiva v času odvzema vzorcev, v katerih jih merimo (Christenson, 1997). Pri povečani sintezi kostnine so povišani kazalci sinteze kostnine, pri povečani resorpciji pa kazalci resorpcije. V primerih, ko sta bolj intenzivna resorpcija in sinteza kostnine (preoblikovanje), so povišane vrednosti kazalcev resorpcije in sinteze. Kadar poteka proces povečane sinteze ali resorpcije kosti manj intenzivno, se spremembe v krvnih ali urinskih kazalcih metabolizma kosti težko ugotovi (Allen, 2003).

Nekateri kazalci kostnega metabolizma precej nihajo pri posameznem osebku in med osebki iste vrste. Na vrednosti pomembno vplivajo **starost** (višje vrednosti na splošno ugotavljamo pri mladih živalih), **spol** (v nekaterih študijah je bil OCN višji pri žrebcih kot pri žrebicah), **pasma oz. tip živali** (npr. pri konjih imajo hladnokrvni nižje vrednosti OCN kot polnokrvni (Lepage in sod., 1998)), **fiziološko stanje** (gravidnost, laktacija) in **fizična aktivnost** (intenzivira metabolizem kosti) (Price in sod., 1995b; Lepage in sod., 2001). Tudi pri mladih bikcih iste starosti so dokazali statistično značilen vpliv fizične aktivnosti na kazalce kostnega metabolizma (Hiney in sod., 2004). Pri ljudeh vpliva tudi prehrana na vrednosti kazalcev kostnega metabolizma, predvsem zaradi obilice kolagena I v obroku (Bjarnason in sod., 2002; Clowes in sod., 2002). Poleg tega pa je pri številnih živalskih vrstah in ljudeh prisotno še **dnevno nihanje** vrednosti nekaterih kazalcev (bALP, OCN, Pyd, Dpd, NTx, CTx) (Swaminathan, 2001; Bjarnason in sod., 2002; Jackson in sod., 2003; Allen, 2003). Pri psih so ugotovili višje vrednosti osteokalcina, ICTP in Dpd zjutraj, najvišje vrednosti bALP pa zgodaj popoldne. Cirkadiano nihanje kazalcev metabolizma kosti so ugotovili še pri konjih, miših, kuncih in podganah (Allen, 2003). CTx naj pri govedu ne bi nihal cirkadiano (Ekelund, 2003). Pri ljudeh so ugotovili nihanje kazalcev kostnega metabolizma tudi glede na letne čase (Woitge in sod., 1998). Tudi pri ovcah in konjih so ugotovili statistično značilno višje vrednosti kazalcev metabolizma kostnega tkiva spomladi v primerjavi z jesenjo (Allen, 2003; Arens in sod., 2007).

Znan je tudi vpliv nekaterih zdravil na vrednosti kazalcev kostnega metabolizma. Predvsem po aplikaciji kortikosteroidov so pri konjih zaznali prehodno znižanje vrednosti OCN (Lepage

in sod., 2001). Tudi po splošni anesteziji so se vrednosti OCN prehodno znižale pri konjih (Grafenau in sod., 1999).

Za kazalce metabolizma kosti, ki izhajajo iz kolagena obstaja nevarnost, da je njihovo povišanje lahko posledica motenj v katerem drugem tkivu (npr. koža, žile, mišičnina), ki vsebuje veliko kolagena tipa I. Nekateri avtorji opozarjajo, da bi lahko predvsem generalizirane bolezni kože vplivale na koncentracijo omenjenih kazalcev metabolizma kosti (Lepage in sod., 2001).

Tudi rezultati za isti kazalec pri istem osebku, dobljeni z različnimi analitskimi metodami, lahko močno nihajo. Zato je pri interpretaciji potrebno vedno navesti še analitsko metodo oz. opremo, s katero smo naredili preiskavo (Allen, 2003).

Zaradi vsega navedenega imajo rezultati analiz kazalcev kostnega metabolizma široke 95% intervale zaupanja, kar otežuje razdelitev posameznikov v skupine in zmanjšuje občutljivost testov.

Mednarodni standardi, na katere bi se lahko sklicevali vsi kompleti za merjenje oz. določanje kazalcev metabolizma kosti, za večino ne obstajajo. Posledica tega je, da rezultati med testi za isti kazalec niso primerljivi.

Kazalci metabolizma kosti, ki jih merimo v krvi, intraindividualno nihajo manj kot tisti, ki jih merimo v urinu. Če jih merimo v urinu, je potrebno vrednosti korigirati glede na urinski kreatinin (Allen, 2003).

2.2.5 KLINIČNA UPORABNOST KAZALCEV METABOLIZMA KOSTI

Biokemijske kazalce metabolizma kosti lahko uporabljamo za ocenjevanje vseh stanj, pri katerih je povečana sinteza, resorpcija ali preoblikovanje kosti ter posredno za oceno mineralne kostne gostote. Največ se uporabljajo pri metaboličnih boleznih kosti. To je pomembno, ker te bolezni na začetku potekajo prikrito, s kazalci kostnega metabolizma pa jih lahko zaznamo še preden se izrazijo tudi klinično (Allen, 2003).

Uporabni so tudi za spremljanje uspešnosti terapije bolezni okostja, pri katerih je moten metabolizem kostnega tkiva (npr. osteoporoza, osteomalacija) (Lepage in sod., 2001; Swaminathan, 2001). Biokemijski kazalci metabolizma kosti so pomembni predvsem za in vivo študije o vplivu bolezni ali zdravil na okostje, kjer so metode ocene kostnega tkiva omejene in če se le da neinvazivne. Pri invazivnih metodah za ocenjevanje metabolizma okostja naletimo na veliko težav, ki so povezane z vprašanji, kot so, npr. ali je poseg upravičen, kolikšen čas je potreben za izvedbo, kolikšni so stroški takšne preiskave (potrebna

je npr. tudi anestezija). Nadalje, če delamo longitudinalne študije, pri katerih ocenjujemo učinek na okostje (npr. zdravila, fizične aktivnosti), te metode ne dajo ustreznega rezultata in hkrati preiskave takih vzorcev opravljajo le redki laboratoriji (Lepage in sod., 2001).

Glavna obolenja krav molznic, pri katerih je prisotna motnja metabolizma kosti oz. Ca, so obporodna hipokalcemija, osteomalacija in sekundarni nutricijski paratiroidizem (*osteodistrophia fibrosa*) (Smith, 2002). Pri zgodnji diagnostiki teh treh bolezni lahko koristi merjenje kazalcev metabolizma kosti. Spremembe vrednosti osteokalcina so ugotovili pri bivolih z osteoporozo, pri govedu z osteomalacijo pa spremenjene vrednosti bALP (Philipov, 1995).

V veterinarski praksi imajo farmske živali velik potencial kot pokazatelji motenj metabolizma kosti zaradi pomanjkanja hranilnih snovi v prehrani, ki jih morajo zato visokoproduktivne proizvodne živali črpati iz okostja (pogosto pri živalih z intenzivno proizvodnjo, npr. mleka, jajc in hitro rastočih) (Liesegang in sod., 2000; Denis in sod., 2000; Norris in sod., 2001; Allen, 2003). Predvsem pri malih živalih in konjih bi jih lahko uporabljali za ugotavljanje in spremljanje terapije sistemskih bolezni kosti. Pomagajo nam pri presoji kostnih novotvorb in tumoroznih metastaz v kosteh. Z njihovo pomočjo lahko ocenjujemo tudi novotvorbe, ki proizvajajo hormone, ki vplivajo na metabolizem kosti. Uporabljajo se lahko tudi za spremljanje celjenja zlomov kosti pri postmenopavzalnih ženskah (Hannon in sod., 1995). Zato jih intenzivno preučujejo pri mesojedih in malih živalih (Komnenou in sod., 2005). Ovce uporabljajo za model pri spremljanju kostnih implantov za potrebe humane medicine, predvsem odziv implanta pri umetno izzvani osteoporozi (Egermann in sod., 2008). Pri govedu so ugotovili spremenjene vrednosti kazalcev kostnega metabolizma pri živalih z artritisom (Philipov, 1996).

Spremembe kazalcev kostnega metabolizma pri ljudeh ugotavljajo tudi pri različnih hormonskih motnjah, ki vplivajo na metabolizem kosti (Bikle, 1997).

Koristni so tudi za spremljanje metabolizma kosti pri fizični obremenitvi, kar pride v poštev pri živalih v športu (Price in sod., 1995a; Henry in sod., 2002; Billinghurst in sod., 2003).

V farmacevtski industriji jih uporabljajo za ugotavljanje vpliva zdravil na metabolizem kosti (Allen, 2003). Uporabni so tudi v toksikoloških študijah (Brzoska in Maniuszko-Jakoniuk, 2005).

Pri konjih daje pomembne informacije tudi pri preučevanju biologije kosti, npr. med odraščanjem, pri obremenitvi (Price in sod., 1995a,b).

2.2.6 GIBANJE KAZALCEV METABOLIZMA KOSTI PRI KRAVAH MED LAKTACIJO IN PRESUŠITVIJO

Holtenius in Ekelund (2005) poročata, da je bila koncentracija CTx biokemijskega kazalca razgrajevanja kostnine najvišja prvi teden po telitvi, po tem se je naslednjih 33 tednov enakomerno zniževala. O podobnih rezultatih poročajo Liesegang in sod. (2000), ki so preučevali 30 SL krav in biokemijski kazalec resorpcije kostnine ICTP. Najvišja koncentracija CTx in ICTP, kot kazalcev razgrajevanja kostnine, prvi teden po telitvi se ujema s splošno ugotovitvijo, da je v tem času resorpcija Ca iz kosti najvišja. V tem času organizem še ni adaptiran na večjo resorpcijo Ca iz črevesja za ohranjanje normokalcemije ob naglo zelo visoki porabi Ca za produkcijo mleka na začetku laktacije (Goff, 2000).

Liesegang in sod. (2000) so ugotovili, da se koncentracija OCN, kazalca sinteze kostnine, po porodu drastično zniža in po tem do približno drugega meseca laktacije narašča, ko doseže vrh, po tem pa se zopet začne počasi zniževati do poroda. To govori za obnavljanje mineralnih zalog v kosteh v tem obdobju. Enako gibanje OCN so v svojih raziskavah ugotovili tudi Holtenius in Ekelund (2005) in Iwama in sod. (2004). Čas presušitve ni vplival na koncentracijo OCN v krvi pri kravah (Davicco in sod., 1990).

Beighle (1999) ugotavlja, da se Ca največ resorbira iz kortikalne kostnine od 30. do 120. dneva PP in ne do 30. dneva PP. Do tega zaključka so prišli na osnovi merjenja koncentracije Ca v kortikalni kostnini krav prvih 30 dni PP, naslednjih 30 dni PP in med 90. ter 120. dnevom PP, ko so ugotovili statistično pomembno ($p<0,05$) višjo koncentracijo Ca v prvih 30. dneh kot v naslednjih meritvah (30. dan in 90. do 120. dan PP). Razlaga za to je, da je kumulativni učinek, ki se ga da statistično zaznati pri vsebnosti Ca v kostnem tkivu, dosežen z zamikom glede na intenzivnost resorpcije kostnine. Biopsati nam govorijo le o vsebnosti, ne kažejo pa nam, kakšen je trenuten metabolizem kosti.

Liesegang in sod. (2000) poročajo o povišanju koncentracije urinskih kazalcev resorpcije kostnine, HYP, Dpd in Pyd v prvih 14 dneh po porodu. Iwama in sod. (2004) pa ugotavljajo, da so vrednosti urinskega Dpd najvišje 14. dan po porodu, nekoliko nižje 21. dan po porodu in najnižje 28. dan po porodu. Dpd so spremljali 14., 21. in 28. dan po porodu pri 16 ČB kravah. Del povišanja omenjenih kazalcev pa so v raziskavi pripisali razgradnji kolagena v maternici zaradi njene involucije.

Black in Capen (1971) sta ugotovila, da je koncentracija hidroksiprolina v urinu pri kravah, ki niso zbolele za obporodno hipokalcemično parezo, povišana zadnji mesec gravidnosti, pri tistih, ki pa so obolele, pa povišanja nista ugotovila.

Ellenberger in sod. (1950) poročajo o kar 9% do 13% izgubi Ca iz okostja krav molznic v prvem mesecu laktacije, ki se kasneje lahko obnovi. Govorimo o laktacijski osteoporozi, ki pomaga ohranjati fiziološki nivo Ca v krvi.

2.3 KALCIJ (Ca) IN FOSFOR (P) PRI GOVEDU

Že v 18. stoletju so znanstveniki odkrili, da so kosti zgrajene iz kalcijevega fosfata, kar je privedlo do uporabe kalcija (Ca) za preventivo rahitisa, ki je desetkal človeštvo že stoletja. Kmalu za tem so tudi pri živalih podobna obolenja okostja povezali s pomanjkanjem Ca. Kasneje se je produktivnost živali povečevala, hkrati z njo pa se je spreminjala prehrana. Postajala je vedno bolj energetsko bogata in je temeljila na zrnju. Razen tega so živali redili v zaprtih prostorih, kjer ni bilo sončne svetlobe, potrebnega vira UV žarkov za nastanek vit. D_3, ki je nujen za učinkovito izkoriščanje Ca. To je privedlo do bolj pogostih bolezni kosti pri živalih.

Na vpliv pomanjkanja fosforja (P) na proizvodnjo živali je prvi opozoril Arnold Teiler leta 1912. V naslednjih 20 letih pa so oblikovali prve uspešne ukrepe za preprečevanje pomanjkanja P (Underwood in Suttle, 1999).

Selekcija živali gre tudi danes v smeri večje proizvodnje. Oskrbovanje visokoproizvodnih molznic s Ca in P še vedno predstavlja problem, saj mnoge krave brez znamenj bolezni okostja zbolijo za akutnim pomanjkanjem Ca ali imajo zdravstvene težave zaradi pomanjkanja P. Še danes predstavlja ustrezna preskrbljenost živali s Ca in P in njun metabolizem pomembno problematiko, ki se intenzivno raziskuje. Predvsem v rejah molznic je problematika Ca in P še posebej aktualna, saj na primer molznica, ki proizvede med laktacijo 9000 kg mleka, z mlekom izloči kar 11,07 kg Ca in 8,56 kg P (Horst, 1986). Oba elementa imata pomembne funkcije tako v trdih kot v mehkih tkivih, zato je ustrezna preskrbljenost z njima nujna za normalno funkcioniranje, rast in prirejo živali.

2.3.1 FUNKCIJE KALCIJA IN FOSFORJA V ORGANIZMU

Ca je prvi, P pa drugi najbolj razširjeni mineral v telesu vretenčarjev. V kosteh in zobeh se nahaja 99% telesnega Ca in 80% telesnega P. Različne kosti v povprečju vsebujejo 36% Ca in 17% P v kostnem pepelu, ene več, druge manj. Ca in P sta nujna za mineralizacijo kostnega matriksa, P pa tudi za njegovo sintezo (Underwood in Suttle, 1999). Količina čistega Ca v telesu srednje velike krave je okoli 7 kg (Weiss, 1993).

Majhen delež Ca (1%), ki ni vezan v kosteh, se nahaja v izvencelični tekočini. Tu je prost, v ionski obliki ter vezan na serumske proteine in kompleksno vezan na organske in anorganske kisline (0,1%). Nekaj Ca je še v celičnih membranah, endoplazmatskem retikulumu (0,9%) in v citosolu (0,00002%). Med 50% - 60% plazemskega Ca je ioniziranega, odgovornega za fiziološke funkcije, kot so prevajanje živčnih dražljajev, krčenje in relaksacija mišic, glikogenoliza v hepatocitih (Goff in Horst, 1997; Bigras-Poulin in Tremblay, 1998). Ca je tudi pomemben kofaktor pri izločanju hormonov v endokrinih organih, npr. pri izločanju insulina. Nadalje je pomemben za stabilizacijo in aktivacijo nekaterih encimov ter pri celičnem ciklu (razmnoževanju celic). Nujno vlogo ima pri strjevanju krvi. Pomemben naj bi bil tudi pri celičnem signaliziranju, vključno z aktivacijo imunskega odgovora (Horst, 1986). Okoli 45% Ca v krvni plazmi je vezanega na krvne beljakovine, približno 5% pa ga je še kompleksno vezanega na citrat, laktat, bikarbonat ali fosfat (Rosol in Capen, 1997).

Dvajset % telesnega P pri sesalcih, ki se ne nahaja v kosteh, je razporejenega po telesnih tekočinah in mehkih tkivih. Tisti, ki se prost nahaja v krvi, je v obliki anorganskega fosfata PO_4^{2-} (80%) in PO_4^{-} (Inoue in sod., 2000, Smith, 2002). Nekateri ga smatrajo za najpomembnejši element v živih organizmih. Nujen je za mineralizacijo kosti. P je sestavni del deoksiribonukleinskih in ribonukleinskih kislin, fosfolipidov celičnih membran, fosfoproteinov, fosfata, ki pomaga vzdrževati osmotski tlak in uravnavati pH organizma, ključno vlogo ima tudi v metabolizmu, vključno s shranjevanjem in prenosom energije v obliki energetsko bogatih molekul (npr. ATP), glukogenezi, transportu maščobnih kislin, sintezi amino kislin in proteinov ter pri delovanjem Na/K črpalke (Ekelund, 2003). Vključen naj bi bil tudi v kontrolo apetita in pomemben za učinkovito izrabo hrane (Underwood in Suttle, 1999). Zaradi vsega omenjenega je nujen za vzdrževanje zdravja, produkcijo in reprodukcijo živali.

2.3.2 NARAVNI VIRI KALCIJA

Primarni vir Ca sesalcev in ptičev je krma, sekundarnega pa predstavlja tisti, ki je naložen v kosteh. Voluminozna krma predstavlja zadosten vir Ca za živali, ki se pasejo, posebno, če paša vsebuje tudi rastline iz družine metuljnic ali leguminoz. Listje leguminoz in trav vsebuje v povprečju dvakrat toliko Ca kot stebla, zato se količina Ca v rastlini s starostjo le-te znižuje, povečuje pa z dodajanjem dušikovih gnojil. V Veliki Britaniji so ugotovili, da je vsebnost Ca v silaži višja kot v senu, pridelanem iz bolj zrele trave. Korekcija kislosti tal z dodajanjem apna zelo malo vpliva na vsebnost Ca v rastlinju. Določene rastline vsebujejo Ca, vezan na oksalate, v taki obliki pa je slabše dostopen, vendar se vampova mikroflora sčasoma adaptira na njih in jih razgrajuje.

Večina koncentratov vsebuje malo Ca. Žita redko vsebujejo več kot 1 g Ca na kg SS krme. Veliko Ca vsebujejo pesni rezanci, vsebujejo pa tudi dosti oksalne kisline, ki veže Ca. Predvsem v semenih stročnic in krmilih je tudi dosti fitinske kisline (fitata), ki tvori s Ca kompleks, ki ga neruminanti ne morejo izkoristiti. Ruminanti ga lahko s pomočjo vampove mikroflore razgradijo in izkoristijo (Underwood in Suttle, 1999).

2.3.3 METABOLIZEM KALCIJA IN NJEGOVA REGULACIJA

Vzdrževanje normalnega nivoja plazemske koncentracije Ca je pod strogim nadzorom endokrinega sistema. Homeostatski mehanizmi pri sesalcih so uravnani tako, da vzdržujejo koncentracijo Ca v zunajcelični tekočini in plazmi na nivoju okoli 2,5 mmol/L. Vzdrževanje normokalcemije je regulirano z ravnovesjem med absorpcijo Ca v ozkem črevesu, resorpcijo Ca iz okostja in resorpcijo z ultrafiltracijo v ledvicah izločenega Ca. Ključno vlogo pri regulaciji imajo hormoni PTH, kalcitriol in kalcitonin. Učinkovitost vzdrževanja normokalcemije je tako visoka, da kljub velikemu nihanju potreb krav molznic po Ca in nekoliko manjšemu pri oskrbi s Ca, zelo redko pride do odstopanja (Goff, 2000).

2.3.3.1 ABSORPCIJA

Absorpcija Ca iz obroka je v veliki meri regulirana hormonsko, kar omogoča vzdrževanje homeostaze. Absorbira se glede na potrebe do stopnje, ki predstavlja maksimalno absorbilnost (absorpcija maksimalnega deleža Ca) za določen obrok. Za mleko je absorbilnost blizu 90%,

pri trdih obrokih pa je pri monogastridih redko pod 50% celotne količine Ca (Underwood in Suttle, 1999). Pri govedu je absorpcijski koeficient Ca, če so živali na voluminoznem obroku, 0,3 – 0,35 (Horst, 1986), če pa od tega odštejemo še Ca, ki se izloča skozi črevesje, dobimo neto absorbcijo 20 do 25% glede na količino v obroku (Fromm in Hierholzer, 2000). Majhne količine Ca se lahko pri ovcah absorbirajo v vampu in vzdolž celotnega črevesa, večina pa v ozkem črevesu (Höller in sod., 1988). V vampu se absorbira le pasivno z difuzijo, v črevesu pa pasivno, skozi tesne stičnice med enterociti (paracelularno) in aktivno skozi enterocite (za kar je potreben 1,25-$(OH)_2D_3$). Kadar je koncentracija Ca v obroku zelo visoka, se ga lahko kar 50% absorbira pasivno predvsem pri monogastridih. Pri prežvekovalcih se zaradi razredčitve v vsebini predželodcev nikoli ne dosega takega deleža pasivne absorpcije. Ugotovili so, da mora biti za večjo pasivno absorbcijo v raztopini kar 6 mmol/L ioniziranega Ca. Nadzor nad aktivno absorpcijo imata posredno PTH (Rattanakul in sod., 2003), ki nastaja v obščitnici, in fiziološko aktivna oblika 1,25-$(OH)_2D_3$, ki ima vpliv na vse tri stopnje aktivne transcelularne absorpcije Ca (Underwood in Suttle, 1999). Obščitnica je občutljiva na zelo majhna nihanja koncentracije ionskega Ca v zunajcelični tekočini. Če se koncentracija zniža, se začne sproščati PTH, ki najprej stimulira resorpcijo Ca v ledvicah. Včasih to zadostuje, da se koncentracija povrne v fiziološko območje, kar povzroči prenehanje izločanja PTH. Kadar pa do tega ne pride, začne pod vplivom PTH nastajati aktivna oblika 1,25-$(OH)_2D_3$ v ledvicah (Horst, 1986). Skozi enterocite (transcelularni prenos) se Ca absorbira v treh stopnjah, ki so vse regulirane s 1,25-$(OH)_2D_3$ (Horst in sod., 2005):

- vstopanje Ca skozi Ca kanalčke TRPV5 in TRPV6 na luminalni membrani enterocita,
- transport skozi enterocit (citosol) do bazolateralne membrane, za kar je odgovoren Ca vežoča beljakovina kalbindin D9k,
- izstop Ca skozi bazolateralno membrano enterocita s pomočjo Ca ATPaze PMCA1b.

Starejše živali imajo manj receptorjev za kalcitriol v enterocitih, zato je pri njih znatno nižja aktivna resorpcija Ca kot pri mlajših živalih. V enterocitih učinkuje 1,25-$(OH)_2D_3$ precej počasi in stimulira transcelularni prenos. Več kot 90% Ca ionov se v citosolu veže na kalbindin (Bronner, 2003). To je tudi limitirajoča stopnja resopcije Ca skozi enterocite (Bronner, 1987). Ko pride Ca do bazolateralne membrane, se izloča v bazolateralni prostor proti 1000-kratnemu koncentracijskemu gradientu s primarnim aktivnim transportom, s pomočjo Ca črpalk, ki so odvisne od Ca-Mg-ATPaze (Wasserman in sod.,1984). 1,25-$(OH)_2D_3$ inducira sintezo Ca-Mg-ATPaze in tako za dva do trikrat poveča aktivnost izločanja Ca iz celice (Horst in sod., 1994). Ca se izloča v bazolateralni prostor tudi s sekundarnim aktivnim transportom s pomočjo Na^+-Ca^{2+}-izmenjevalca (Wasserman in Fullmer, 1995).

Količina kalbindina se spreminja tudi glede na količino Ca v obroku ter hitrost rasti živali, in sicer je pri nizki koncentraciji Ca v obroku in pri intenzivni rasti koncentracija kalbindina višja (Underwood in Suttle, 1999).

2.3.3.2 KALCIJ, NALOŽEN V KOSTEH

Enako pomemben za homeostazo Ca je tudi Ca, ki je naložen v kosteh. V kosteh je Ca v dveh oblikah. Ena oblika je lahko dostopen Ca, raztopljen v tekočini, ki obdaja celice v kosteh. Tega Ca je malo; pri odrasli kravi ocenjujejo njegovo količino na 6 do 10 g (Vagg in Payne, 1970). Njegova funkcija je zaradi majhne količine primerljiva pomenu glikogena za vzdrževanje normoglikemije. Druga oblika je Ca, naložen v kompaktnem kostnem matriksu, ki služi kot počasi sproščujoč vir. Hormona, ki regulirata resorpcijo Ca iz hrane, 1,25-$(OH)_2D_3$ in PTH, sta odgovorna tudi za mobilizacijo Ca iz kosti. Hondrociti ali hrustančne celice in osteoblasti imajo jedrne receptorje za 1,25-$(OH)_2D_3$. Osteoklasti reagirajo na 1,25-$(OH)_2D_3$ indirektno preko osteoblastov. Za hitro mobilizacijo raztopljenega Ca so ob stimulaciji s 1,25-$(OH)_2D_3$ in PTH zelo pomembne celice, ki oblagajo kosti, ki hitro prenesejo Ca iz kostne tekočine v izvencelični prostor (Horst in sod., 2005). Pri govedu pride do zvečane resorpcije kosti šele 48 ur po stimulaciji s PTH, pri kravah s hipokalcemijo pa še kasneje (Horst, 1986). Pri podganah in ovcah se lahko metabolizem kosti v pozni brejosti in na začetku laktacije uravna tako, da se iz kosti mobilizira do približno ene petine Ca. Ta fenomen imenujemo laktacijska osteoporoza. Pri kravah so ugotovili do okoli 13% znižanje celokupne količine Ca v kosteh do viška laktacije (Ellenberger in sod., 1950). Pri ovcah so ugotovili, da je ta proces lahko pri visokoproduktivnih živalih celo nujen, ker se iz obroka ne more zadovoljiti potreb po Ca, kljub temu pa žival ostane normokalcemična (Braithwaite, 1983a). Ugotovili so, da resorpcija kostnega tkiva za potrebe nadomeščanja Ca pri visokoproduktivnih živalih s popolnoma kalcificiranimi kostmi ne škoduje, če je omejena na 10 do 20% skupne kostne mineralne mase in če se lahko rezerve v kosteh ponovno obnovijo pred naslednjim obdobjem intenzivne resorpcije. Stopnja zmožnosti izgradnje kostnine in kasneje resorpcije se s starostjo krav zmanjšuje (Ramberg in sod., 1976). Zato prihaja pri starejših kravah do naglega znižanja Ca (pogosto tudi do klinične hipokalcemije) v ožjem poporodnem obdobju, ki se lahko ponavlja v 7 do 10 dnevnih intervalih še cel prvi mesec laktacije pri tako imenovanih kravah cikličarkah. Gre za to, da se morajo homeostatski mehanizmi stalno prilagajati na povečano potrebo po Ca zaradi potreb laktacije. Ciklično ponavljanje hipokalcemije prvi mesec laktacije so nekateri povezali tudi z aplikacijo 1,25-

$(OH)_2D_3$, ker naj bi ta zavrla naravno sintezo 1,25-$(OH)_2D_3$, po porabi apliciranega, pa se mora ponovno vzpostaviti naravna sinteza (Hove, 1986).

2.3.3.3 IZLOČANJE KALCIJA Z URINOM IN IZTREBKI

Absorpcija Ca je tesno povezana s potrebami po Ca, zato se višek Ca v obroku izloči z iztrebki (Smith, 2002).

Izločanje Ca s fecesom in urinom ima majhen pomen pri homeostazi Ca. Pri prežvekovalcih so ugotovili konstantno nizek nivo izločanja Ca z iztrebki, nekje na stopnji 16 mg Ca na kg žive teže živali, tudi če so močno znižali vsebnost Ca v obroku ter ne glede na status Ca (Underwood in Suttle, 1999). Krava, težka 500 kg, tako izloči z iztrebki 5 – 7 g endogenega Ca (to je brez Ca, ki ni bil absorbiran iz hrane) (Goff, 2000). Povečano uživanje suhe snovi iz krmnega obroka povzroča proporcionalni dvig z iztrebki izločenega Ca na kilogram žive teže živali pri ovcah (Underwood in Suttle, 1999; Goff, 2000).

Pod vplivom PTH se lahko bistveno poveča resorpcija Ca iz glomerularnega filtrata in zniža izločanje (Horst in sod., 2005). Pri molznicah z metabolično alkalozo se lahko bistveno dvigne izločanje Ca z urinom. Metabolična alkaloza povzroča, da so receptorji za PTH v ledvičnih tubulih spremenjeni, kar povzroči slabši učinek PTH in ne pride do učinkovite stimulacije resorpcije Ca iz ledvičnih tubulov (Underwood in Suttle, 1999).

V glomerulih ledvic se z ultrafiltracijo izloča ioniziran in kompleksno vezan Ca, kar predstavlja približno 54 do 58% skupnega krvnega Ca (Fromm in Hierholzer, 2000). Osemindevetdeset % ultrafiltriranega Ca se reabsorbira in sicer 65% v proksimalnih tubulih, ostalo pa v distalnih. Resorpcija v proksimalnih tubulih je paracelularna in transcelularna in je hormonsko regulirana. V distalnih tubulih se večina Ca absorbira pasivno, le delno, nekje 10% resorpcije pa je hormonsko pogojene s PTH in 1,25-$(OH)_2D_3$ (Hoenderop in sod., 2001).

2.3.3.4 PREPREČEVANJE HIPERKALCEMIJE

Polipeptidni hormon kalcitonin, ki ga izločajo parafolikularne ali C celice ščitnice, pa je odgovoren za zmanjševanje Ca v krvi (ob hiperkalcemiji). Glavni stimulator njegovega izločanje je povišan nivo ionskega Ca v krvni plazmi in izvencelični tekočini. Njegovo izločanje spodbujajo tudi črevesni polipeptidi, gastrin, pankreozimin in glukagon, kar povzroča izločanje kalcitonina že, ko je obrok zaužit, še preden se Ca absobira, da ne pride do prehude postprandialne hiperkalcemije. Stimulira nalaganje Ca v kosti (zmanjšuje aktivnost

osteoklastov in zvišuje aktivnost osteoblastov) ter izločanje Ca in fosfatov skozi ledvice (zavira resorpcijo iz ledvičnih tubulov) (Smith, 2002). Pri sesalcih je kalcitonin dosti manj pomemben od PTH, njegova naloga je predvsem preprečevanje postprandialne hiperkalcemije in prekomerne razgradnje kostnega tkiva pri živalih v laktaciji.

2.3.3.4 PREPREČEVANJE HIPOKALCEMIJE

Glej poglavje Obporodna hipokalcemija na starni 84.

2.3.4 NARAVNI VIRI FOSFORJA

Vsebnost P v rastlinah močno variira in je odvisna od količine P v zemlji, starosti rastline (s starostjo se znižuje) in klimatskih razmer (v tropskem podnebju rastline vsebujejo manj P kot v zmernem). Metuljnice vsebujejo nekaj več P od trav (3,5 g proti 2,3 g P /kg SS), so pa tudi izjeme (Underwood in Suttle, 1999). Količina P je v listih in steblih približno enaka, drastično pa pade s staranjem rastline v celotni rastlini, še posebej, če je suša. Travna silaža vsebuje več P kot seno, verjetno zaradi tega, ker se za silažo kosi bolj mlade rastline. Po raziskavah lahko ovce in govedo absorbirajo velik delež (absorpcijski koeficient je 0,64 – 0,86) fosforja v suhih in svežih rastlinah (Ekelund, 2003).

Raziskave, opravljene na volih, kažejo, da so se raje pasli na travnikih, ki so bogato pognojeni s P, in tudi na splošno so iskali rastline, ki vsebujejo več fosforja (Jones in Betteridge, 1994). Z raziskavo, ko so iz požiralnikove fistule jemali vzorce pojedenega travinja za ugotavljanje vsebnosti P in ga primerjali z vsebnostjo P v ročno natrganem travinju iz istega travnika, so ugotovili, da vsebuje pojedeno dosti več P od natrganega. Zaradi tega so številni raziskovalci opustili ročno jemanje vzorcev travinja za ugotavljanje preskrbljenosti s P. To velja še posebno za travinje, ki vsebuje rastline različnih starosti, palatabilnosti in z različno vsebnostjo P. Ker se P izloča tudi s slino, je treba v tem primeru ugotavljati le ^{32}P, ki je iz rastlin. Na omejenih področjih, kjer živali enakomerno in dobro popasejo rušo ali pa je ta zelo enotna, pa dajejo ročno natrgani standardizirani vzorci skoraj enake rezultate vsebnosti P kot tisti, pridobljeni iz požiralnikovih fistul (Underwood in Suttle, 1999).

Žitarice vsebujejo relativno dovolj P po celotni rastlini, rastlinska beljakovinska krmila pa še več. Večina P (50 – 80%) je v fitatni obliki, ki ga vampova mikroflora lahko razgrajuje in tako postane dostopen prežvekovalcem. Rastline shranjujejo fosfate v obliki fitata. Prežvekovalci, ki dobijo dovolj koncentratov v obroku, nimajo pomanjkanja P. Za

neprežvekovalce pa to ne velja. P, vezan v fitatih, postane zadovoljivo dostopen monogastridom, če se žitom dodaja fitaza (nekaj jo vsebujejo že sama žita) (Murry in sod., 1997).

2.3.5 METABOLIZEM FOSFORJA

Nadzor metabolizma P je drugačen od Ca. Če je P prisoten v anionski (fosfati) obliki, se zelo učinkovito absorbira, tako kot drugi anioni, ne glede na potrebe. Iz mleka se skoraj 100% absorbira (Braithwaite, 1983b). Višek P se izloča skozi ledvice in črevesje. Pri prežvekovalcih na voluminoznem obroku se intenzivno izloča s slino in se ga zato večina izloči skozi črevesje. Skozi ledvice se ga večina izloči pri monogastridih in prežvekovalcih na obroku, ki stimulira majhno količino izločene sline (briketi in drugi koncentrati). V krvi je P v obliki anorganskega fosfata (aP). Stroge hormonalne regulacije koncentracije aP v krvi ni, zato serumske vrednosti aP močno variirajo pod in nad ledvičnim pragom, ki znaša 2 – 3 mmol/L pri zdravih živalih (Smith, 2002). Koncentracija aP v krvi je indirektno pod vplivom homeostatskih mehanizmov za Ca. Vzdrževanje normalne izvencelične koncentracije aP preko absorpcije iz črevesa in resorpcije iz okostja je potrebno za normalno rast kosti in mišic, nadomeščanje endogenih izgub z iztrebki in urinom ter produkcijo mleka (Reinhardt in sod., 1988).

2.3.5.1 ABSORPCIJA FOSFORJA PRI ODRASLIH PREŽVEKOVALCIH

Odnos med absorbiranim in zaužitim P je linearen za velik razpon zaužitega P pri živalih po odstavitvi. Absorbilnost znaša 0,74 pri odstavljenih jagnjetih (Braithwaite, 1983b) in 0,83 pri odstavljenih teletih (Underwood in Suttle, 1999). P v obliki inositol tetra-, penta- in heksa fosfata (fitati) v slami in žitaricah se intenzivno hidrolizira v vampu s pomočjo mikrobne fitaze, pri čemer se sprošča fosfat (Morse in sod., 1992). V obroku, revnem s P, se lahko pri govedu absorbilnost nekoliko poveča, kar je količinsko pomembno (Coates in Ternouth, 1992), pri zelo bogatem pa rahlo zmanjša (Challa in Braithwaite, 1989). V glavnem se P absorbira v proksimalnem delu ozkega črevesa (Reinhardt in sod., 1988). Nekaj se ga absorbira tudi v vampu, prebiralniku in siriščniku, vendar je malo znanega o mehanizmu absorbcije (Breves in Schröder, 1991).

2.3.5.2 SEKRECIJA FOSFORJA S SLINO PRI PREŽVEKOVALCIH

Za razliko od neprežvekovalcev, prežvekovalci izločajo velike količine fosforja v slino. Prežvekovalci izločajo dve vrsti sline po kakovosti. Ena je izotonična slina, ki je bogata z bikarbonati in fosfati ter se kontinuirano izloča, druga pa hipotonična slina, ki se izloča predvsem med hranjenjem ter ni posebno bogata z bikarbonati in fosfati (Underwood in Suttle, 1999). Predvsem med prežvekovanjem se izloča velika količina sline, ki je zelo bogata s P, tako da predstavlja slina večji vir P kot hrana (Tomas, 1973). Glavni vpliv na izločanje P v slino ima koncentracija aP v plazmi. Odnos med sekrecijo aP v slini in koncentracijo aP v plazmi je pri govedu med 1 in 3 mmol/L linearen ter enak dvojni količini izločenega aP v slino. Koncentracija P v slini je 3 do 8 krat večja kot v plazmi. Ekelund (2003) poroča, da je koncentracija P v slini goveda kar 11,9 – 23,2 mmol/L, v plazmi pa le 1,3 – 2,6 mmol/L. Odvisna je od količine izločene sline in P v obroku. S povečevanjem vlaknine v obroku se izločanje P s slino povečuje, medtem ko se ekskrecija P z urinom zmanjšuje. V poskusu na ovcah so ugotovili, da se količina s slino izločenega P podvoji, če se dolžina sena podaljša iz 1 na 6 cm (Underwood in Suttle, 1999). P iz sline se reabsorbira v črevesu kar v 70 do 80% (Care, 1994), zato krma, ki stimulira sekrecijo silne, tudi izboljšuje izrabo P v obroku (Underwood in Suttle, 1999). Tako se s slino vsak dan pri govedu izloči od 30 do 90 g P, ki je tudi glavni pufer za puferiranje vampove vsebine (Goff, 2006).

2.3.5.3 IZLOČANJE FOSFORJA Z IZTREBKI IN URINOM

Količina P, ki ga prežvekovalci izgubijo z iztrebki, je odvisna od koncentracije P v slini, količine izločene sline in učinkovitosti absorpcije v črevesu (Breves in sod., 1995). Pri jagnjetih so ugotovili, da je učinkovitost absorpcije genetsko pogojena, saj se zelo razlikuje med različnimi pasmami jagnjet in tudi med posameznimi jagnjeti iste pasme (Field in sod., 1986). Kadar je bil obrok zelo deficitaren glede P, naraste absorptivna sposobnost zanj nad normalno zgornjo mejo, kar je imelo za posledico zmanjšanje izločanja P z iztrebki (Breves in sod., 1995). Tako lahko pri obroku, ki je zelo reven s P, prav P, ki naj bi se izločil z iztrebki, postane glavni vir P. Z naraščanjem količine P v obroku pride do zasičenja kapacitete endogene ekskrecije P, zato se večina absorbiranega P, ki je nad potrebami organizma, izloči z urinom. Pri energetsko bogatem ali peletiranem obroku, kjer ni večjega izločanja sline, pride lahko teoretično do večjega izločanja P z urinom in pomanjkljive oskrbe živali s P, ki onemogoča popolno mineralizacijo kosti. Kljub temu tak obrok ne privede do pomanjkanja P

pri prežvekovalcih. Nujna količina P, ki se izloči z urinom, zahteva večjo pozornost glede dodajanja P k obroku za neprežvekovalce (Underwood in Suttle, 1999).

2.3.5.4 RAST KOSTI IN MINERALIZACIJA PRI MLADIH ŽIVALIH IN VSEBNOST FOSFORJA V OBROKU

Nezadostna oskrba s P iz obroka se pri rastočih živalih uravnava tudi z uravnavanjem rasti in mineralizacije okostja. Kot pri Ca, tudi pri P obstajajo razlike med živalmi, ki rastejo, in odraslimi. Odnos med rastjo kosti in mineralizacijo je delno odvisen tudi od količine serumskega P (Underwood in Suttle, 1999). Pri odstavljenih jagenjčkih na obroku, revnem s P, so ugotovili nadaljnjo rast okostja. V poskusu, kjer so krmili jagenjčke z obrokom, revnim s P, se je teža skeleta povečala v 4 mesecih za 19%, medtem ko se je vsebnost P zmanjšala za 11% (Field in sod., 1975). Prilagoditev je povzročila zmanjšanje količine kostnega matriksa predvsem v spongiozi kosti. V kolikšni meri lahko taka adaptacija še omogoča rast, je v veliki meri odvisno od vrste živali (Underwood in Suttle, 1999).

2.3.5.5 MINERALIZACIJA KOSTI PRI ODRASLIH ŽIVALIH IN VSEBNOST FOSFORJA V OBROKU

Pri odraslih živalih vseh vrst lahko pride pri procesu razgradnje kostnega tkiva do sproščanja znatne količine P, naloženega v okostju. P, ki se resorbira iz okostja, lahko postane bolj pomemben vir P za zdravstveno stanje in proizvodnjo živali od tistega, zaužitega s hrano. Izračunali so, da morata krava ali ovca za vzdrževanje maksimalne dnevne količine P izločenega z mlekom mobilizirati dnevno le 0,7% rezerve v okostju (Underwood in Suttle, 1999). Pri tem obstajajo tri težave:

- proces mobilizacije P ni pod istim hormonskim nadzorom kot pri Ca (koncentracija PTH se zniža pri pomanjkanju P),
- pri resorpciji kosti se za mlečno proizvodnjo pridobi premalo P glede na Ca (v mleku je Ca : P = 1,3 : 1, v kosteh pa 2 : 1) (Goff, 2000),
- izkoriščanje zaloge P iz kosti je manj učinkovito kot pri Ca (več se ga izgubi z iztrebki, kljub nizkemu aP v plazmi – aP se izloča s slino in po tem v iztrebke) (Underwood in Suttle, 1999).

2.3.5.6 HORMONSKA REGULACIJA METABOLIZMA FOSFORJA

Učinkovita in specifična hormonska regulacija metabolizma P ne obstaja. Povezana je s hormonsko regulacijo metabolizma Ca.

PTH zavira tubularno resorpcijo P v ledvicah in tako povzroča večje izločanje P z urinom (to vodi v višanje koncentracije Ca zaradi razmerja med koncentracijo Ca in P v krvi). Ob pomanjkanju P je dostikrat prisotna hiperkalcemija, ki pa preprečuje izločanje PTH. PTH stimulira nastajanje 1,25-$(OH)_2D_3$ in tako posredno resorpcijo Ca in P v črevesju ter osteoklastno aktivnost, ki povzroča sproščanje Ca in P iz kosti. Na vsakih 10 Ca ionov, sproščenih iz kosti, se sprosti tudi 6 fosfatnih ionov (Ekelund, 2003). PTH tudi stimulira izločanje P s slino (Smith, 2002).

Različne vrste živali se različno hormonsko odzovejo na pomanjkanje P. Pri prašičih in piščancih s pomanjkanjem P pride do povečanja 1 alfa hidroksilazne aktivnosti v ledvicah in 1,25-$(OH)_2D_3$ v plazmi, medtem ko tega niso zaznali v poskusu pri ovcah (Breves in Schröder, 1991). Pri govedu so višjo stopnjo nastajanja 1,25-$(OH)_2D_3$ v ledvicah ugotovili šele, ko je koncentracija plazemskega aP dosegla vrednost 0,3 do 0,6 mmol/L (Goff, 2006). Vit. D ima verjetno manjšo vlogo pri metabolizmu P pri prežvekovalcih, ker lahko izrabljajo P iz fitatov in bolje izrabljajo zaloge P iz okostja (Underwood in Suttle, 1999).

2.3.6 VPLIV PREHRANE NA METABOLIZEM KALCIJA

Eden prvih načinov preventive poporodne hipokalcemije, ki se še danes uporablja v praksi, je pokladanje obroka revnega s Ca (8-10 g Ca / dan / kravo), v obdobju presušitve krave (Smith, 2002). Na ta način se homeostatski mehanizmi uravnajo tako, da se večja količina Ca črpa iz kosti (ohranja se aktivnost obščitnice), ob nastopu laktacije pa je organizem prilagojen na pomanjkanje ter zato bolj učinkovit v absorpciji Ca iz prebavil in telesnih rezerv. Krave, ki dobivajo obrok zelo bogat s Ca (>100g Ca/dan), skoraj ves Ca iz prebavil absorbirajo pasivno, mehanizme aktivne absorpcije pa imajo zavrte in otopele (Jorgensen, 1974; Ramberg in sod., 1984). Problem tovrstne preventive je, da se težko pripravi obrok s tako nizko vsebnostjo Ca in tudi da je potrebno izgubljeni Ca iz kosti kasneje nadomestiti, drugače pride do oslabitve okostja in izčrpanja zalog. Glede priprave obroka revnega s Ca si danes pomagajo z zeolitom A (to je natrijev aluminijev silikat), ki ima sposobnost vezave zadostne količine Ca, da pride do tega efekta (Goff, 2006a).

Režim, pri katerem se krmi zakislen obrok v času okoli poroda, je enostavnejši od prejšnjega. S takim obrokom želimo doseči kompenzirano metabolično acidozo organizma. V takem stanju organizma se poveča občutljivost ledvic na PTH, kar povzroči zvišano produkcijo 1,25-$(OH)_2D_3$ in na ta način izboljšano absorpcijo Ca iz črevesa (Gaynor, 1989; Gašperlin, 2000). Hkrati pride tudi do boljšega delovanje PTH in 1,25-$(OH)_2D_3$ na resorpcijo kostnine in tako večjega črpanje telesnih rezerv Ca (Horst in sod., 1994; Goff in sod., 1995). Kisel obrok je tisti, v katerem je razlika med kationi (K^+ in Na^+) in anioni (Cl^- in sulfat (SO^{2-}_4)) (DCAD) ≤ 0 mEq/Kg SS (Horst in sod., 1994). Ustreznost odmerjanja anionskih soli, s katerimi obrok zakisljujemo, lahko spremljamo z merjenjem pH urina, ki mora biti pod 7,5, kar je znamenje kompenzirane metabolične acidoze. Tudi krmljenje silaže v primerjavi s senom že samo po sebi zmanjšuje verjetnost hipokalcemije. Za zakislitev obroka se dodaja anionske soli. Najbolj se priporoča dodajanje $CaSO_4$, $CaCl_2$, amonijevega sulfata ali amonijevega klorida. Prednost $CaSO_4$ in $CaCl_2$ je, da zagotavljata tudi Ca, ki ga mora krava za učinkovito delovanje z anionskim obrokom zaužiti vsaj 140g (1,2 do 1,6 % Ca) na dan (Horst in sod., 1994). Tak obrok začnejo postopno uvajati v prehrano visoko brejih molznic 3 tedne pred terminom telitve. Po telitvi tako dieto prekinejo in vrnejo živali na normalno prehrano. V nasprotnem začne dieta negativno vplivati na zdravje krave in njeno prirejo mleka. Slaba stran anionskih soli je tudi njihova neokusnost, kar povzroča zmanjšanje palatibilnosti obroka. Pri krmljenju obroka z anionskimi solmi moramo biti zato pozorni na konzumacijo živali in na to, da živali ne začno prebirati obroka (Smith, 2002). Ugotovili so, da če je količina dodanih anionov nad 300 mEq/Kg SS obroka, ga bodo živali zaužile manj, kar pa ima lahko za posledico druge metabolične bolezni, predvsem maščobno infiltracijo in degeneracijo jeter in ketozo. Zaradi tega so za dodajanje aionskih soli primerni le obroki, ki imajo DCAD pod +200 mEq/kg SS (Horst in sod., 1994). Na splošno je potrebno skrbeti, da je v krmi za presušene krave čim manj K (glavni kation v zeleni krmi), kar se uravnava z gnojenjem krmnih rastlin (Underwood in Suttle, 1999; Martens in Schweigel, 2003). Iz obroka presušenih krav moramo odstraniti vse katione, ki jih dodajamo kravam v laktaciji, na primer: $NaHCO_3$, $CaCO_3$, NaCl.

Tudi pomanjkanje Mg v obroku povzroča slabše izločanje PTH oz. slabši odziv obščitnice ter tudi ciljnih tkiv na PTH, kar lahko privede do hipokalcemije (Rude in sod., 2004). Pomanjkanje Mg je prisotno predvsem ob prebitku K v obroku (povzroča alkalotično stanje organizma), ker se v tem primeru slabše resorbira, zato je v takih okoliščinah še posebej pomembno izdatno dodajanje Mg (Goff, 2006a).

Tudi prevelika količina P v obroku in kasneje v krvi negativno vpliva na encim 1α hidroksilazo, ki je vključen pri sintezi aktivne oblike vit. D_3 v ledvicah in posredno na pomanjkanje Ca (Horst, 1986).

Ugotovili so tudi, da krmljenje prevelike količine krme in energije v času presušitve vpliva negativno na mobilizacijo Ca po porodu (Underwood in Suttle, 1999).

Krmi, ki ima prenizko vsebnost Ca, se ta lahko dodaja tudi v obliki prahu kalcita (kalcijev karbonat) ali dolomita. Zameša se ju med krmila ali krmno mešanico.

Predvsem krmila iz žit in mlada trava v fazi bujne rasti vsebujejo malo Ca. Ca je slabše dostopen, če je v krmi vezan v oksalate (Underwood in Suttle, 1999).

Dodajanje masti v obrok za molznice naj bi povzročalo nastajanje Ca mil v vampu, vendar pa to ne vpliva na dostopnost Ca, saj se mila v ozkem črevesu razgradijo, kar povzroči sproščanje prostega Ca, ki se v največji meri absorbira v ozkem črevesu. Zato prilagajanje vsebnosti Ca v obroku, ki mu je bila dodana maščoba, ni potrebno. Na tržišču so celo komercialno prisotna mila Ca z maščobnimi kislinami kot vir energije za molznice (Goff, 2000).

2.3.7 VPLIV PREHRANE NA METABOLIZEM FOSFORJA

Za optimalno izkoriščanje P iz obroka je potrebna zadostna količina in pravo razmerje s Ca. Idealno razmerje Ca : P pri prežvekovalcih je 1,5 – 2 : 1. Do motenj prihaja šele, če je razmerje Ca : P večje od 4 : 1 ali manjše od 1 : 1 in še posebej, če je v obroku majhna količina P (Horst, 1986). NRC (2001) celo navaja, da je bila produktivnost krav približno enaka vse do razmerja 7 : 1 in da se je učinku razmerja Ca : P dajal prevelik pomen, vsaj, dokler je količina P zadostna. Tudi visoke koncentracije Mg, Mn, K, Zn, Mo, Al in Fe zmanjšujejo prebavljivost P, ker z njim tvorijo netopne komplekse (Ekelund, 2003).

Pri pašnih živalih lahko pride do kroničnega pomanjkanja P zaradi majhne vsebnosti P v paši, ki je rezultat majhne vsebnosti rastlinam dostopnega P v zemlji (< 10 mg/kg suhe snovi) in klimatskih dejavnikov. Pri visoko proizvodnih kravah lahko kritična meja naraste do 30 mg/kg suhe snovi. Kislost zemlje in obilica Fe tudi zmanjšujejo vsebnost P v rastlinah. To stanje potencira še nastop suše, ko rastline ostarijo in odvržejo seme (te vsebujejo tudi malo energije, beljakovin in drugih hranilnih snovi, zato samo nadomeščanje P največkrat ne izboljša stanja). Če se na takih območjih posadi rastline, ki so tolerantne na te razmere, to

povzroči še poslabšanje stanja oskrbljenosti s P, ker je delež P v suhi snovi v tem primeru še manjši (Underwood in Suttle, 1999).

Pomanjkanje P je redkejše pri malih prežvekovalcih, najverjetneje zaradi tega, ker imajo nižje razmerje med kostmi in telesno težo in zato manjše potrebe za rast, bolje izbirajo rastline, ki so bogatejše s P, imajo krajši letni reprodukcijski cikel in zato tudi krajšo laktacijo, kar jim omogoča obnovo zalog (Underwood in Suttle, 1999).

Prežvekovalci dobro izkoriščajo P, vezan v fitate, ki predstavlja kar 0,35 do 0,70 vsega rastlinskega P, ker jih razgrajuje mikroflora v vampu. Zato se prebavljivost P glede na različne vire ne razlikuje signifikantno (Ekelund, 2003).

Plazemska koncentracija aP dobro korelira z absorpcijo P iz obroka (Goff, 2006).

2.3.8 POTREBE PO KALCIJU IN FOSFORJU

Največ Ca in P potrebujejo mlade hitro rastoče živali, s starostjo, ko je okostje izgrajeno, pa se potrebe po Ca in P močno zmanjšajo. Izjema so živali po porodu, ki imajo visoko prirejo mleka, zaradi česar izgubljajo večje količine Ca in P.

Pri visoko brejih ovcah narastejo potrebe po Ca na isto raven kot pri ovcah v laktaciji, še posebej, če nosijo dvojčke ali trojčke. V povprečju naj bi imele ovce skozi celotno leto 3g Ca /kg SS. Pri kravah je ta vrednost nekoliko višja, ker je čas, v katerem lahko nadomestijo porabljene zaloge Ca, kratek. Krave potrebujejo skozi celo leto v povprečju 4,5 g Ca /kg SS, kar je za 50% več kot ovce. To je približno 20 do 30 g Ca na dan za vzdrževanje, ob predpostavki, da se ga 50% absorbira (Underwood in Suttle, 1999). Med gravidnostjo pri kravah potrebe po Ca počasi rastejo, pri dobrih molznicah pa z začetkom laktacije narastejo še za 33 in več odstotkov. Če krava hujša med laktacijo (molze iz lastnih rezerv), se potrebe po Ca še dodatno zvišajo (tudi do 80%) (Horst in sod., 1994). Kolostrum krav vsebuje od 1,7 do 2,3 g/L, mleko pa od 1 do 1,1 g/L Ca (Goff, 2000) oz. 25 do 30 mmol/L mleko, kolostrum pa 62 do 75 mmol/L, kar je 10-krat oz. 30-krat več kot v krvi (Horst in sod., 2003a)

Pri visoko breji kravi plod za potrebe rasti porabi do 10 g P na dan iz materine krvi (House in Bell, 1993).

Teleta potrebujejo za optimalno rast, ne da bi izrabljala lastne rezerve, 2,2 – 4,3 g P /kg SS, jagnjeta pa 1,7 – 3,8 g P /kg SS obroka. Za vsak kg prirasta mehkega tkiva (npr. mišice) med rastjo se porabi 0,3 g P. Krave v laktaciji potrebujejo 1,9 – 3,9 g P /kg SS oz. okoli 0,36% SS, odvisno od proizvedenega mleka (Underwood in Suttle, 1999). Povprečna koncentracija aP v kravjem mleku je 0,95 g/L mleka (Goff, 2000). Breje ovce in ovce v laktaciji pa potrebujejo

2,0 – 2,9 g P /kg SS (Underwood in Suttle, 1999). Pri teh normativih so upoštevali nekoliko nižje absorbcijske koeficiente, kot jih ugotavljajo danes, zato se jih da, brez škode za živali, zmanjšati za 20 ali še nekaj več odstotkov (Ternouth in Coates, 1997). Če je v obroku več P, kot ga žival potrebuje, se mu prebavljivost linearno s količino na videz zmanjšuje, saj mehanizma za shranjevanje viška P ne obstaja. Če P v danem trenutku ni potreben, ga govedo izloči z iztrebki (Ekelund, 2003). Molznica potrebuje za vzdrževanje 15 do 20 g P na dan (Underwood in Suttle, 1999). Valk in Beynen (2003) predlagata formulo za izračun potreb po P pri kravah molznicah: (19+1,43×kg mleka) g P/dan za 600-kg kravo.

Krava, ki v laktaciji proizvede 9000 kg mleka, z njim izloči 11,07 kg Ca in 8,56 kg P. Če se računa, da je na primer dostopnost Ca 38%, P pa 45%, morajo krave samo za potrebe laktacije v povprečju zaužiti 90 – 100 g Ca in 60 – 70 g P na dan (Underwood in Suttle, 1999). Taka so tudi priporočila (NRC, 2001), ki navajajo, da 650 kg krava s proizvodnjo 45 kg mleka na dan potrebuje 76,5 g absorbiranega Ca in 68,8 g absorbiranega P oz. 180 g Ca in 97 g P na dan. To je glede na konzumacijo krme približno 0,7% Ca in 0,35% P v suhi snovi obroka.

Na koncu brejosti potrebuje plod 10,3 g Ca in 5,4 g P na dan (House in Bell, 1993). Goff (2008) ugotavlja, da 0,85 do 1,0% Ca v SS obroka za visoko breje krave ne vpliva negativno na ohranjanje normokalcemije po porodu.

2.3.9 VSEBNOST KALCIJA IN FOSFORJA V KRMI

Paša praviloma vsebuje zadostne količine Ca, predvsem, če so v njej prisotne rastline iz družine metuljnic. Metuljnice v zmernem in subtropskem pasu v povprečju vsebujejo 14,2 in 10,1 g Ca /kg SS, trave pa 3,7 in 3,8 g Ca /kg SS (Underwood in Suttle, 1999). Po podatkih NRC (2001) vsebujejo trave, ki uspevajo tudi v hladnejšem delu leta 5,6, travne silaže 5,5, seno iz trav 5,8, slama 3,1, koruzna silaža 2,8, silaža iz metuljnic 13,4 in seno iz metuljnic 15,2 g Ca na kg SS. Krave v laktaciji potrebujejo na paši tudi delež metuljnic. Med posameznimi vrstami rastlin obstajajo razlike v vsebnosti Ca, vendar nimajo bistvenega vpliva na preskrbljenost živali. Starost rastlin pa ima pomemben vpliv. Listi rastlin na splošno vsebujejo 2-krat več Ca od stebel. Travna silaža največkrat vsebuje več Ca (približno 6,4 g/kg SS) od sena (približno 5,6 g/kg SS) (Givens in sod., 1990). Apnenje travnikov ima majhen vpliv na vsebnost Ca v rastlinah. Med drugo voluminozno krmo vsebuje koruzna silaža od 2,0 do 5,0 g Ca /kg SS, žitna slama pa okoli 3 g Ca /kg SS. Paša lahko predstavlja problem glede oskrbljenosti s Ca le na kislih tleh v času vlažnega vremena v tropskem podnebju, ko je prisotna bujna rast (Underwood in Suttle, 1999).

Pomembna je tudi vsebnost oksalata v travah, na katero pa se lahko pri postopnem privajanju na tak obrok vampova mikroflora prilagodi in ga izkorišča. Popolnoma pa ga verjetno ne more izkoristiti, saj so ugotovili prisotnost oksalatnih kristalov v iztrebkih krav (Underwood in Suttle, 1999).

Koncentrati vsebujejo malo Ca, žita največkrat pod 1 g Ca /kg SS, stranski produkti žit pa redko več kot 1,5 g na kg SS. Tako vsebuje koruza 0,2 g, pšenica 0,6 g, ječmen in oves pa 0,6 – 0,9 g Ca /kg SS. Rastlinska proteinska krmila vsebujejo največkrat od 2,0 do 4,0 g Ca /kg SS, razen zmletih repičnih semen, ki vsebujejo 8,4 g Ca /kg SS. Pesni rezanci vsebujejo dovolj Ca, 6,0 do 7,5 g Ca /kg SS in malo P ter so zato odlično dopolnilo žitnim obrokom (Underwood in Suttle, 1999).

Ribja in kostno mesna moka pa vsebujeta od 50 do 100 g Ca na kg SS (Givens in sod., 1990).

Vsebnost P v posameznih vrstah rastlin je zelo variabilna, zato lahko živali na paši zaužijejo dosti več P od tistega, ki ga mi določimo v ročno odvzetem vzorcu. V povprečju vsebujejo rastline v zmernem podnebju (3,5 g P /kg SS) več P od tropskih (2,3 g P /kg SS). Metuljnice vsebujejo nekaj več P (3,2 g P /kg SS) od trav (2,7 g P /kg SS) (Underwood in Suttle, 1999). P je po celotni rastlini razporejen približno v enaki koncentraciji. S starostjo rastline pa njegova količina pada, še posebno, če je prisotna tudi suša. V povprečju vsebuje travna silaža 3,2 g P /kg SS, seno pa 2,2 g P /kg SS (Givens in sod., 1990).

Koncentrati vsebujejo približno enako in zadostno količino P, in sicer od 2,7 do 4,3 g P /kg SS. Še več P vsebujejo krmila iz rastlinskih beljakovin, 5,0 do 12,0 g P /kg SS. Nihanje v vsebnosti P je lahko zelo veliko v posameznem krmilu. Za primer lahko vzamemo ugotovitve Ekelunda (2003), ki je v beljakovinah iz krompirja izmeril vsebnost P od 2,1 do 4,6 g/kg SS in v pšenici od 2,9 do 4,8 g/kg SS. Večina P v koncentratih je v fitatni obliki, ki pa je zaradi vampove mikroflore za prežvekovalce dobro prebavljiva (absorbilnost = 0,78 do 0,81) (Underwood in Suttle, 1999).

Mesna, kostno mesna in ribja moka vsebujejo veliko P (>30g P /kg SS) z visoko relativno absorbilnostjo tudi za prašiče in perutnino (>85%) (Underwood in Suttle, 1999).

2.3.10 POMANJKANJE KALCIJA IN BOLEZNI

Nezadostna oskrba prežvekovalcev s Ca povzroča različne motnje. V poskusu, ko so ob odstavitvi krmili jagnjeta z obrokom revnim s Ca, je po 4 tednih prišlo do slabšanja apetita živali in posledično do zaostajanja v rasti (Field in sod., 1975). Dolgotrajno pomanjkanje Ca in P pri domačih živalih povzroča tako pri mladih kot starih anomalije okostja in sklepov. Klinično se kaže kot **rahitis** pri mladih živalih, za katerega sta značilna širjenje epifizno-diafiznih hrustancev in prekomerna količina nekalcificiranega osteoida, ki povzroča povečanje koncev dolgih kosti in kostohondralnih stikov. Pri odraslih živalih se bolezen imenuje **osteomalacija** in nastane zaradi prevelike mobilizacije Ca iz kosti, kar povzroča, da je v kosteh, ki imajo že zaprte rastne ploščice, preveč nemineraliziranega matriksa. Take živali so slabotne, pogosteje šepajo in so nagnjene k zlomom kosti (Smith, 2002).

Osteoporoza pa označuje stanje, ko kosti vsebujejo manj mineralov in proporcionalno tudi manj kostnega matriksa (Delmas, 1993). Stopnja mineralizacije je v tem primeru normalna. Pri kravah lahko pride do laktacijske osteoporoze, če izgubijo 10 do 13% Ca iz okostja (Goff, 2004). Zanimivo je, da v literaturi še ni opisan vpliv pomanjkanja Ca v obroku na razvoj in kvaliteto zob.

Pri molznicah lahko pomanjkanje Ca v obroku skozi daljše obdobje privede do izčrpanja telesnih rezerv v okostju in posledično zmanjšane proizvodnje mleka. Zmanjšana proizvodnja mleka je verjetno delno tudi posledica zmanjšanega apetita ob kroničnem pomanjkanju Ca v obroku (Goff, 2000).

Obporodna hipokalcemična pareza ali obporodna ohromelost (puerperalna pareza) je metabolična bolezen, ki nastane zaradi motenj homeostaze Ca. Povzroča jo akutno pomanjkanje ioniziranega Ca v organizmu, ki onemogoči delovanje živčnega sistema in muskulature. Ca homeostaza se poruši zaradi naglega izgubljanja Ca pogojenega z začetkom produkcije mleka (Lean in sod. 2006). Klinično je značilen akuten nastop mišične oslabelosti, ležanja in na koncu šoka ter smrti pri govedu. Najpogosteje nastopi v prvih 72 urah po porodu. Izjemoma se lahko pojavi tudi do nekaj tednov pred ali po porodu (Goff, 2003). Najbolj ogrožene so dobre molznice po tretji telitvi (Bigras-Poulin in Tremblay, 1998). Glej posebno poglavje o obporodni hipokalcemiji na strani 84.

Pri pitanem govedu, v času intenzivne rasti, se ob transportih lahko pri pomanjkanju Ca pojavlja **transportna tetanija** (Smith, 2002). Verjetno je v povezavi tudi z dejstvom, da med transporti živali ne dobijo krme in zato tudi Ca ne.

2.3.11 POMANJKANJE FOSFORJA IN BOLEZNI

Pomanjkanje P v obroku povzroča biokemijske spremembe v tkivih in krvi, ki jih lahko spremljajo klinično zaznavna znamenja. Pri jagnjetih, ki so jih 14 do 18 mesecev krmili z zmerno deficitarnim obrokom s P, so ugotovili 20% zmanjšanje koncentracije pepela v vretencih in 8% v dolgih kosteh glede na skupino ovac, ki so bile dobro oskrbljene s P (Underwood in Suttle, 1999). Field in sod. (1975) pa so ugotovili tako zmanjšanje količine pepela kot tudi organske snovi v kosteh jagnjet, krmljenih z obrokom, ki je bil reven s P. Iz navedenega je razvidno, da je odstotek pepela lahko zavajajoč podatek pri ocenjevanju pomanjkanja, ker podceni posledice pomanjkanja. Ugotovili so tudi, da se P in Ca bolj intenzivno izplavljata iz reber kot iz okončin (pri odvzemu vzorcev in primerjanju rezultatov je to potrebno upoštevati). Slabše mineralizirane kosti so tudi dokazano manj močne. Klinično se pomanjkanje P kaže enako kot pomanjkanje Ca, zato moramo preden sklenemo, da je P vzrok temu stanju, biti sigurni o zadostni oskrbljenosti živali s Ca in beljakovinami, ki so tudi potrebni za normalno mineralizacijo. Pri in vivo študijah mineralizacije kosti je zato priporočljivo vzeti več vzorcev v daljšem časovnem obdobju, idealno z iste kosti (v literaturi najbolj priporočajo rebro) (Underwood in Suttle, 1999).

Zgodnji znak pomanjkanja P je znižanje serumskega aP pod spodnjo fiziološko mejo (hipofosfatemija) (na Kliniki za prežvekovalce v Ljubljani imamo za spodnjo mejno vrednost aP pri govedu 1,61 mmol/L (Jazbec, 1990)), dvigovanje aktivnosti ALP in rahel dvig serumskega Ca. Na vsebnost aP v serumu vpliva tudi čas po hranjenju (postprandialno povišanje), stres in proizvodnja mleka pa jo znižata ter tudi mesto odvzema krvi (odvzem iz v. cudalis mediana in v. subcutanea abdominis da višje vrednosti kot odvzem iz v. jugularis) in kasnejše ravnanje z odvzetimi vzorci krvi (hranjenje, kako nastaja krvni strdek, čas odločitve seruma, sama analiza ...). To je tudi vzrok, da je mejna vrednost aP v serumu v obliki intervala (Underwood in Suttle, 1999).

Hipofosfatemija je pogosto prisotna ob porodu. V tem primeru je največkrat posledica večjega izločanja PTH zaradi hipokalcemije, ki povzroče večje izločanje P z urinom in slino, ne pa pomanjkanja P v obroku. Ko se vsebnost Ca v krvi zopet dvigne na normalno, se v tem primeru največkrat normalizira tudi vsebnost aP (Goff, 2006). Za krave, ki ležijo zaradi hude hipofosfatemije, je značilno, da so mentalno dobro aktivne, pogosto imajo tudi ohranjen primeren apetit, le vstati ne morejo (Goff, 2000).

Znižanje koncentracije P v slini ni tako očitno, ker je že normalna koncentracija P 3 do 8 krat večja v slini kot v krvi. Odvisna je tudi od pretoka sline. Tudi koncentracija P v urinu ni dober indikator oskrbljenosti živali s P, ker ga je že pri dobri oskrbljenosti zelo malo. Predvsem obrok, ki povzroča majhno porabo sline, poveča koncentracijo P v urinu. V iztrebkih je del endogenega P in del tistega, ki ga žival dobi s hrano. Vrednosti pod 2 g na kg suhe snovi iztrebka kažejo skupaj s serumsko vrednostjo aP pod 1,0 mmol/L na slabo oskrbljenost s P (Underwood in Suttle, 1999).

Pomanjkanje P se klinično kaže s slabo rastjo, zmanjšanim apetitom in slabo izrabo krme. Predvsem prežvekovalci postanejo ob dolgotrajnem pomanjkanju (nekaj tednov ali mesecev) popolnoma neješči (Field in sod., 1975). Tudi prežvekujejo manj, kar povzroči zmanjšano izločanje sline in zato tudi P. Zelo značilen je tudi pojav želje po uživanju neprežvekovalske hrane. Žival je lahko alotriofagična ali bolj specifično sarkofagična, osteofagična. To je zelo nevarno, predvsem na področjih, kjer je prisoten botulizem ali antraks. Po infuziji P je alotriofagija pri živalih z deficitom P izginila že v 1 uri. Incidenca travmatske indigestije je višja v rejah kjer primanjkuje fosforja (Gregorović, 1992). Pri živalih s pomanjkanjem P se pogosto pojavljajo tudi reprodukcijske motnje: tihe pojatve, anestrija, nepravilen estrus, ki onemogoča koncepcijo. Pomanjkanje P močno vpliva na proizvodnjo mleka (Underwood in Suttle, 1999), verjetno pa je ta tudi posledica slabšega apetita. Če se pomanjkanje še nadaljuje, pride pri odraslih živalih do **osteomalacije**, pri mladih pa do **rahitisa**, kar povzroča spontane zlome, šepanje in slabo celjenje zlomov (Smith, 2002). Hudo akutno pomanjkanje P v pozni brejosti ali na začetku laktacije lahko povzroči, da žival **obleži**. V tem primeru pogosto ugotovimo koncentracijo aP v serumu okoli 0,3 mmol/L (Goff, 2006). Pri mlečnem govedu je povezana s pomanjkanjem P tudi **poporodna hemoglobinurija**. Najpogosteje nastopi v 6 tednih po porodu. Zanjo so značilni intravaskularna hemoliza, anemija in hemoglobinurija ter pogosto na koncu smrt krave (Goff, 2000). Hemoliza naj bi bila posledica motenj glikolize in nastajanja ATP v eritrocitih. Pomanjkanje ATP povzroča krhkost eritrocitov in nagnjenost k hemolizi. Živali so še bolj nagnjene k temu stanju, če imajo hkrati prisotno še pomanjkanje Se, Cu, ketozo in nezadostni antioksidantni status (Jubb in sod., 1990).

Pri visokoproizvodnih kravah v zgodnji laktaciji lahko mejno pomanjkanje povzroči spremembe v parkeljni roževini in ležanje (Gerloff in Swenson, 1996).

Po nekaterih podatkih naj bi bilo pomanjkanje P najbolj razširjeno deficitarno stanje od mineralov in tudi ekonomsko najpomembnejše pri pašni živini v svetu (Ekelund, 2003).

2.3.12 PREBITEK KALCIJA

Predoziranje Ca v obroku pri prežvekovalcih ne povzroča težav, pri neprežvekovalcih pa je zaradi tega znana sekundarna motnja absorpcije P, Mn in Zn (Underwood in Suttle, 1999). Poročajo, da je pri vsebnosti Ca nad 1% SS prišlo do zmanjšanega apetita živali, čeprav obstajajo poročila, da 1,8% Ca v SS ni povzročalo nikakršnih težav. Ker je Ca kation, lahko dodatni Ca v obroku v manjši meri deluje proti acidozi vampa (NRC, 2001).

2.3.13 PREBITEK FOSFORJA

Krmljenje prevelikih količin P, še posebej, če obrok vsebuje tudi veliko Mg, povzroča pri ovcah nastajanje sečnih kamnov. Rainhardt in Conrad (1980) poročata tudi o večji incidenci obporodne pareze in hipokalcemije (antagonizem pri resorpciji Ca iz obroka) pri krmljenju obroka v katerem je prebitek P. Posledica tega je tudi večja incidenca s hipokalcemijo povezanih obolenj. Drugače predoziranje ne povzroča škode pri prežvekovalcih (Smith, 2002). Prihaja pa tudi do izgubljanja drage surovine in dodatnega obremenjevanja okolja (Ekelund, 2003). Najvišja, še sprejemljiva, vsebnost P v obroku goveda je 1% SS (NRC, 2001).

2.3.14 GIBANJE SERUMSKEGA KALCIJA IN ANORGANSKEGA FOSFATA MED LAKTACIJO IN PRESUŠITVIJO KRAV

V našem okolju imamo za normalno vrednost Ca pri kravah molznicah 2,25 do 2,99 mmol/L, aP pa 1,61 do 2,26 mmol/L (Jazbec, 1990). V študiji, ki sta jo opravila Bigras-Poulin in Tremblay (1998) na 1021 HF kravah v Kanadi, ki niso kazale znamenj obporodne pareze, so se vrednosti celokupnega serumskega Ca prvi dan po porodu gibale okoli 2,03 ± 0,26 mmol/L, 7 dni po porodu pa okoli 2,26 ± 0,18 mmol/L, serumskega aP pa prvi dan po porodu okoli 1,78 ± 0,48 mmol/L, 7. dan pa okoli 1,93 ± 0,39 mmol/L. Starejše krave so imele nižje koncentracije Ca in aP kot mlajše. Podobne rezultate so dobili tudi Ramberg in sod. (1984). Tudi Horst in sod. (1994) poročajo, da imajo skoraj vse krave prve dni po porodu bolj ali manj razvito hipokalcemijo. V tem primeru govorimo o fiziološki poporodni hipokalcemiji, ki je povezana z začetkom laktacije, ko homeostatski mehanizmi še niso docela prilagojeni močno povečani potrebi po Ca zaradi sinteze kolostruma (vsebuje 30-kratno serumsko

koncentracijo Ca, to je 62 - 75 mmol/L) in mleka (vsebuje 10-kratno serumsko koncentracijo Ca, to je 25 - 30 mmol/L). Krava z visoko prirejo mleka potrošiti od 20- do 30-kratnik normalne količine Ca v krvni plazmi za potrebe sinteze mleka na dan. Zato se homeostatski mehanizmi adaptirajo na večjo porabo Ca in aP, kar omogoči, da se vse do naslednjega poroda koncentraciji Ca in aP gibljeta v mejah normalnih vrednosti. Predvsem sredi laktacije so krave popolnoma odvisne le od absorpcije Ca iz črevesa, zato lahko zaradi pomanjkanja Ca v obroku, njegove nedostopnosti (zaradi vezave v manj prebavljive snovi) ali kateregakoli drugega vzroka neješčnosti (tudi npr. med estrusom, zaradi hude vročine) pride do akutne hipokalcemije v tem obdobju (Goff, 2003).

2.4 VITAMIN D IN NJEGOVA VLOGA V METABOLIZMU KALCIJA

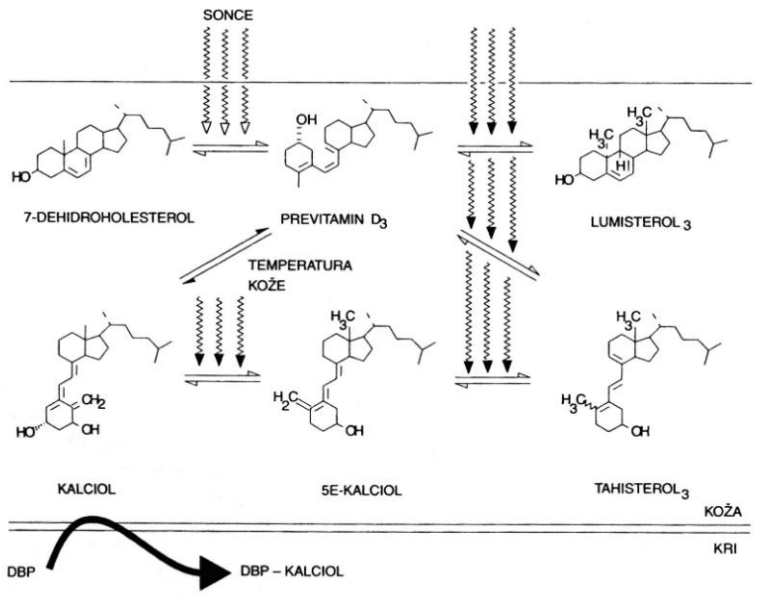
Že na začetku 20. stoletja so raziskovalci ugotovili, da ima vitamin D pomembno vlogo pri absorbciji Ca iz črevesa. Vitamin D je lipofilni (topen v maščobah) vitamin in je eden najpomembnejših esencialnih bioregulatorjev presnove Ca in aP pri živalih. Skupaj s peptidnima hormonoma parathormonom in kalcitoninom vzdržuje homeostazo Ca in aP. V skladu s priporočili IUPAC-IUB se izraz vitamin D nanaša na vse steroide, ki imajo kakovostno enake biološke učinke kot holekalciferol. Holekalciferol postane biokativen šele po dveh zaporednih hidroksilacijah in sicer v 25-hidroksi-D_3 (kalcidiol) v jetrih, nato pa še v ledvicah v 24,25-$(OH)_2D_3$ ali 1,25-$(OH)_2D_3$ (kalcitriol). Kalcitriol nastaja lahko v zadostni količini v organizmu, če je ta dovolj izpostavljen sončnemu obsevanju. Ergokalcigferol ali vitamin D_2, ki je druga glavna oblika vitamina D, pa nastaja v rastlinah ali njihovih delih po obsevanju z UV žarki (Lips, 2006). Ena I.E. vitamina D_3 je 0.25 μg vitamina D_3 (Underwood in Suttle, 1999).

Tabela 1: Trivialna nomenklatura snovi iz skupine vitamina D (Osredkar in Marc, 1996)

Staro trivialno ime	**Priporočeno trivialno ime**
holekalciferol	kalciol ali holekalciferol (**vit. D_3**)
25-hidroksiholekalciferol	kalcidiol
1α, 25-dihidroksiholekalciferol	kalcitriol
ergokalciferol (vit. D_2)	erkalciol ali ergokalciferol
1α, 25-dihidroksiergokalciferol	erkalcitriol
1α, 24R, 15-trihidroksiholekalciferol	kalcitetrol

2.4.1 BIOSINTEZA, RAZPAD IN IZLOČANJE VITAMINA D_3

Ob zadostni izpostavljenosti živali sončni svetlobi pride v koži do zadostne sinteze kalciola za potrebe organizma. Nastaja iz provitamina D_3, ki se pod vplivom UV svetlobe (valovna dolžina 290 do 320 µm) tvori iz 7-dehidroholesterola. Koža je bogat vir 7-dehidroholesterola (Rosol in Capen, 1997).

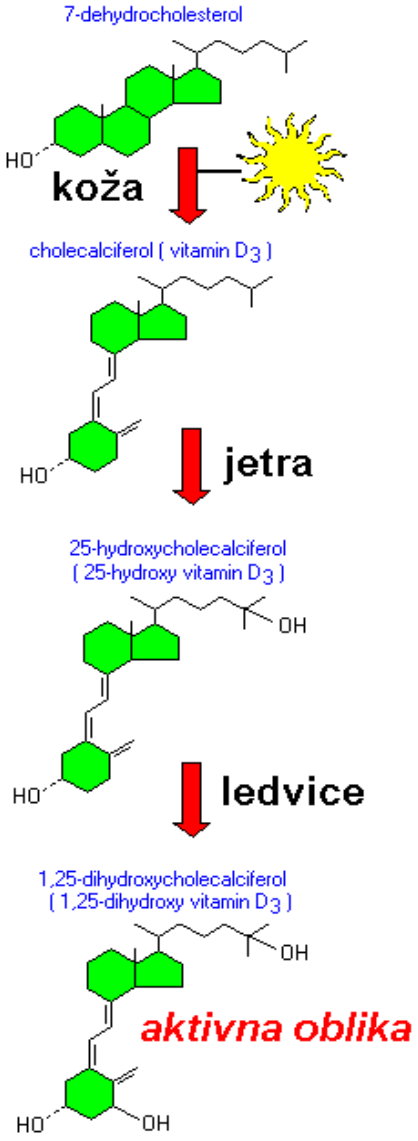


Shema 4: Nastajanje kalciola v koži. Lumisterol$_3$, 5E-kalciol in tahisterol$_3$ so biološko neaktivne oblike kalciola, ki nastajajo pri dolgotrajnem sončnem obsevanju in ne morejo prehajati iz kože v kri (DBP (vitamin D vezoča beljakovina) nima afinitete do njih) in predstavljajo rezervo vitamina v koži (Osredkar in Marc, 1996). Višek se ju izloči z odmrlo kožo. DBP transportira kalciol iz kože po krvi do jeter, kjer se vrši nadaljnja aktivacija.

Pri per oralnem dajanju vitamina D_3 ali D_2 se ta pasivno, z difuzijo, resorbira vzdolž celotnega ozkega črevesa z ostalimi maščobami in prehaja v limfatično cirkulacijo. Jetra ga prevzemajo in pretvarjajo v kalcidiol (25-OHD_3), ki je po tem glavna oblika cirkulirajočega vitamina D. Pri ljudeh se veže v 90% na hilomikrone in 9,5% na vitamin D vežočo beljakovino v krvni plazmi, ki je α_2-globulin. V ledvicah se lahko pretvori v kalcitriol, kadar primanjkuje Ca, ob višku Ca pa se pretvarja predvsem v 24,25-$(OH)_2D_3$ (Reinhadt in Hustmyer, 1987). Govedo z rastlinsko krmo dobi predvsem vit. D_2 (to je s sončno (UV) svetlobo aktiviran rastlinski sterol ergosterol), ki se kasneje pretvori v vit. D_3 ali pa enako kot kalcitriol v jetrih in ledvicah v še

bolj aktivna metabolita ergosterola, 25 hidroksiergosterol in 1,25 dihidroksiergosterol (Rosol in Capen, 1997; DeGaris in Lean, 2008).

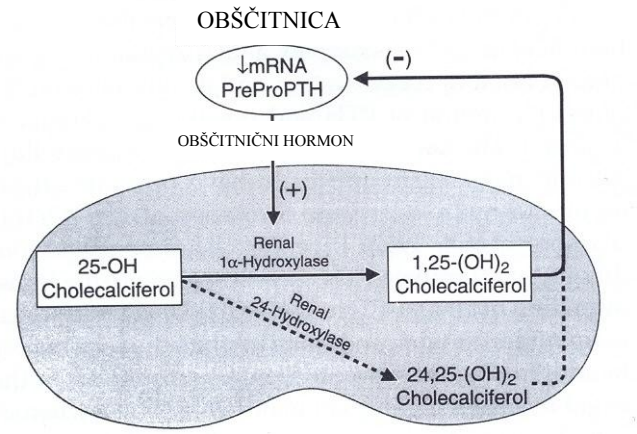
Kalciol se v telesu lahko skladišči v maščobnem tkivu, skeletni mišičnini, pljučih, jetrih, srcu in plazmi (Osredkar in Marc, 1996).



Shema 5: Bioaktivacija 7-dehidroholesterola do aktivne oblike vit. D_3

Bioaktivacija kalciola poteka v jetrih in ledvicah. V jetrih se kalciol hidroksilira v kalcidiol. V manjši meri se lahko hidroksilira tudi v ozkem črevesu in ledvicah. Encim, ki to katalizira, je kalciol-25-hidroksilaza in se nahaja v mikrosomih v povezavi z endoplazmatskim retikulumom. Njegovo aktivnost uravnava koncentracija kalciola v jetrih. Kalcidiol prehaja v kri, kjer se veže na beljakovine. V ledvicah lahko hidroksilacija kalcidiola poteka na dveh

mestih, na C_1 ali C_{24}. Na mestu C_1 katalizira reakcijo kalcidiol-1α-hidroksilaza (krajše 1-hidroksilaza), na mestu 24 pa kalcidiol-24-hidroksilaza (krajše 24-hidroksilaza). Oba encima se nahajata v mitohondrijih epiteljnih celic proksimalnega dela ledvičnih tubulov. Aktivnost obeh encimov je regulirana in recipročna. Če se poveča koncentracja kalcitriola, pride do inhibicije 1-hidroksilaze in aktivacije 24-hidroksilaze. Posledica je nastajanje 24-hidroksikalcidiola namesto kalcitriola. Nastajanje kalcitriola regulirajo še PTH, Ca, aP, kalcitonin, prolaktin, estradiol, testosteron, inzulin in rastni hormon. PTH je najpomembnejši regulator 1α hidroksilaze v ledvicah (Horst, 1986; Hanai in sod., 1990).



Shema 6: Regulacija nastajanja kalcitriola v ledvicah: povišana koncentracija PTH (posledica hipokalcemije) močno stimulira delovanje 1α-hidroksilaze in nastajanje kalcitriola; kalcitriol zavira izločanje PTH in tudi direktno delovanje 1α-hidroksilaze (negativna povratna zveza); kadar je kalcitriola in Ca dovolj se iz 25-OHD_3 tvori 24,25-$(OH)_2D_3$ (Rosol in Capen, 1997)

Ugotovili so, da se 1,25-$(OH)_2D_3$ sintetizira v manjši meri tudi drugje, npr. v mielomskih celicah, kostnih celicah, kožnih celicah, med nosečnostjo tudi v posteljici, poleg glavnega mesta sinteze, ki so ledvice (Goff in sod., 1988; Osredkar in Marc, 1996). V teh tkivih deluje parakrino in regulira diferenciacijo in delovanje celic. Njegova sinteza je pod vplivom citokinov (Lips, 2006).

V krvi je prostega manj kot 5% kalcitriola, ostali pa je vezan na plazemske beljakovine, predvsem pa na vit. D vežočo beljakovino. Prosti kalcitriol z lahkoto prehaja po celicah zaradi svoje lipofilnosti, kopiči pa se le v celicah, ki imajo zanj intracelične receptorje (Horst, 1986).

Glavno mesto razgradnje kalcitriola in 24-hidroksikalcitriola so jetra. Tu prihaja do konjugacije z glukuronsko kislino. Nastajajo pa še drugi presnovki, vsi pa se izločajo v žolč. Druga mesta razgradnje so še ledvice in črevesne celice (Osredkar in Marc, 1996).

2.4.2 MEHANIZEM DELOVANJA VITAMINA D

Mehanizem delovanja je identičen mehanizmu delovanja drugih steroidnih hormonov. Specifične celice v tarčnem organu ali tkivu imajo specifične intracelične receptorske beljakovine za hormon. Ko se hormon veže na njih, ima nastali kompleks receptor-hormon veliko afiniteto za jedrne sestavine in se zato premakne v jedro, kjer se veže na vitamin D odzivni element na vitamin D odzivnem genu (npr. za osteokalcin) in spodbuja njegov prepis (transkripcijo) v mRNA in translacijo, nastajanje določenih beljakovin (npr. kalbindin, osteokalcin, ostopontin, 24-hidroksilaza). Nastale beljakovine modulirajo celično delovanje (Reinhadt in Hustmyer, 1987). Na primer v epiteljnih celicah ozkega črevesa so to beljakovine, ki so odgovorne za vse tri stopnje aktivne absorpcije Ca (glej poglavje o absopciji Ca). Specifične receptorske beljakovine so razen v črevesju, okostju, ledvicah in koži tudi v mlečni žlezi, trebušni slinavki, obščitnicah, hipofizi, posteljici in drugih tkivih, kjer delujejo parakrino. Zanimivo je, da so ugotovili v β celicah otočkov trebušne slinavke razmeroma veliko koncentracijo Ca vezoče beljakovine. Pri živalih so dokazali, da pride ob pomanjkanju vit. D do motenj izločanja insulina (Koshy, 1982).

2.4.3 BIOLOŠKI PROCESI, KI JIH NADZORUJE VITAMIN D

Glavna naloga vitamina D je vzdrževanje homeostaze Ca v organizmu (glej tudi poglavje o Ca na strani 50). Najpomembnejša mesta, s stališča homeostaze Ca, na katere deluje njegova aktivna oblika kalcitriol so ozko črevo, okostje in ledvice. V ozkem črevesu spodbuja absorbcijo Ca in fosfata, v ledvicah resorpcijo teh ionov, v okostju pa mobilizacijo in vgrajevanje mineralov (Osredkar in Marc, 1996; Horst in sod., 2005). Pri kravah, ki so imele pred porodom obrok z nizko vsebnostjo Ca, so po porodu ugotovili višjo koncentracijo kalcitriola (Green in sod., 1981). Obratno pa so pri kravah krmljenih z obrokim, ki je bil bogat s Ca pred porodom, po porodu ugotovili visoko koncentracijo metabolitov vit. D, ki imajo lahko antagonistični učinek na delovanje kalcitriola (Horst in Reinhardt, 1983). Horst in sod.

(1994) poročajo, da potrebuje črevesje krave približno 24 ur po stimulaciji s kalcitriolom, da se poveča resorpcija Ca.

Nedavno je bila ugotovljena vloga vitamina D tudi v imunskem sistemu. Najprej so ugotovili, da imajo otroci z rahitisom pogosteje infekcije in da te potekajo v težji obliki kot pri neprizadetih otrocih. Kasnje se je iskazalo, da imajo njihovi monociti za 30-40% zmanjšano kapaciteto fagocitoze kot pri zdravih vrstnikih, razen tega pa so ugotovili tudi, da imajo njihovi nevtrofilni granulociti defektno gibljivost. Pri miših in ljudeh z izrazitim pomanjkanjem vitamina D so ugotovili tudi anemijo in zmanjšano celularnost kostnega mozga, ki se je po terapiji z vit. D hitro popravila. Receptorje za vitamin D so ugotovili v monocitno/makrofagnih linijah celic, timocitih in limfocitih, katerih delovanje tudi modulira (Reinhadt in Hustmyer, 1987). Tudi mišične celice vsebujejo receptorje za vitamin D in zadostna količina vitamina D omogoča optimalno mišično funkcijo. Pomanjkanje vitamina D naj bi imelo vlogo tudi pri nastanku avtoimunih bolezni, multiple skleroze, diabetesa melitusa (vpliv na β celice pankreasa ter pozitivno povezanost na senzitivnost na inzulin) in raka (Lips, 2006).

2.4.4 HIPOVITAMINOZA D

Hudo pomanjkanje vitamina D povzroča pri mladih živalih rahitis (motena je mineralizacija okostja) in pri odraslih osteomalacijo. Pri osteomalaciji je trabekularna in kortikalna kostnina prekrita z debelimi plastmi osteoida. Pomanjkanje vitamina D povzroča tudi večje izločanje PTH, zaradi nizke koncentracije Ca in 1,25-$(OH)_2D_3$, kar ima za posledico večjo aktivnost kostnega metabolizma in predvsem resorpcijo kostnine. Izgublja se kostna masa, kar pripomore tudi k osteoporozi (Lips, 2006). Razen na okostje pa pomanjkanje deluje tudi na slabše delovanje ostalih organov, tkiv in celic za katere je vitamin D pomemben.

2.4.5 HIPERVITAMINOZA D

Kadar v organizem vnašamo velike količine vitamina D_2 in D_3 lahko pride do zastrupitve z njim. To je mogoče pri nepravilnem dodajanju vitamina D v obrok ali pa pri prevelikem odmerjanju zaradi preventive obporodne hipokalcemične pareze. Znaki zastrupitve pri ljudeh so slabost, izguba apetita, glavobol, bolečine v trebuhu, krči, bruhanje, driska in poliurija. Povišana je serumska koncentracija Ca, kar lahko povzroči kalcifikacijo mehkih tkiv,

predvsem ledvic, srca, pljuč in arterij (Osredkar in Marc, 1996). Podobne znake so ugotovili tudi pri govedu: potrtost, anoreksijo, zmanjšano prirejo mleka, izcedek iz oči, togost muskulature, ki lahko privede do ležanja, poliurije, polipnoe, ki jo lahko spremlja podkožni emfizem in tudi smrt. Zaradi hiperkalcemije je pogosto prisotna aritmija. Pri govedu so pri prekomernem dajanju vit. D_3 v povezavi s preprečevanjem obporodne pareze ugotovili metastatično poapnevanje mehkih tkiv (mišic, kit, ledvic, pljuč, srca, arterij (aorta)), imenovano tudi kalcinoza tkiv, ki privede do motenj funkcije. Breje živali so bolj nagnjene k zastrupitvi in prav tako tudi živali, ki so slabo oskrbljene z vitaminom A (Littledike in Horst, 1980).

Po naravni poti izredno redko prihaja do prekomerne količine vit. D_3 v telesu, posebej v zmernem podnebju (Mello, 2003). V rastlinah je prisoten provitamin D_2 (ergosterol), ki se pod vplivom UV žarkov pri sušenju rastlin pretvarja v za sesalce aktivno obliko vit. D_2. Vendar njegova količina ni tako visoka, da bi povzročal težave. Za nočne rastlinojede naj bi bila to edina uporabna oblika vit. D (Horst, 1986). Na področju evropskih Alp poročajo o zastrupitvi goveda s travo rumenkasti ovsenec (*Trisetum flavescens*), ki vsebuje veliko 1,25-OH-holekalciferol-glikozidov (Underwood in Suttle, 1999).

Do zastrupitve goveda lahko pride tudi zaradi zauživanja rodenticidov na osnovi vitamina D.

V naših podnebnih razmerah se srečujemo predvsem s premajhno oskrbo z vit. D in ker se ga v jetrih lahko shrani le manjša količina, ga je smotrno krmi dodajati (v obliki vitaminsko-mineralnih mešanic, koncentracije 80.000 I.E./kg ali krmnih mešanic, v koncentraciji okoli 2.000 I.E./kg; v obroku goveda naj bo okoli 300 I.E. vitamina D/kg) (Underwood in Suttle, 1999). Nekateri poročajo, da je toksična doza vitamina D pri per os zauživanju že 2200 do 25000 I.E./kg krme. Plazemska koncentracija vitamina D med 20 in 50 ng/mL kaže na povečano konzumacijo ali parenteralno aplikacijo. Na zastrupitev kaže koncentracija vitamina D nad 80 ng/mL v krvnem serumu goveda. Prizadete živali so hiperkalcemične in hiperfosfatemične, pojavljajo pa se tudi hiperkalciurija, izostenurija in glede na napredovalost stanja tudi uremija. Patoanatomsko je diagnostično metastatično distrofično poapnenje mehkih tkiv (pljuč, srca, aorte, tetiv in mišic) (Littledike in Horst, 1982).

2.4.6 UPORABA VITAMINA D ZA PREVENTIVO OBPORODNE HIPOKALCEMIJE

V literaturi opisujejo uporabo različnih metabolitov vit. D in njegovih sintetičnih analogov (vitamin D_3, vitamin D_2, 25-hidroksivitamin D_3, 1α-hidroksivitamin D_3, 1α, 25-hidroksivitamin D_3, 24F-1α, 25-hidroksivitamin D_3, 1α, 25-hidroksivitamin D_3-glikozid) za per oralno ali parenteralno dajanje pred porodom kot preventivo obporodne pareze krav (Horst in sod., 2003a). Njihov učinek se izkorišča preko bolj učinkovite absorpcije Ca v črevesu (Goff in sod., 1988) in verjetno tudi večje resorpcije Ca iz okostja (Littledike in Horst, 1982; Murray in sod., 2008).

Ena od prvih objav v zvezi z obporodno hipokalcemijo je navajala dajanje visokih doz vitamina D_3 v obrok pred porodom. Tak protokol dajanja je povzročil povišano koncentracijo Ca za okoli 12 ur po aplikaciji. Če do telitve ni prišlo v tem času, terapija ni imela nobenega učinka na incidenco obporodne hipokalcemične pareze (Hibbs in sod., 1947). Hibbs in Conrad (1960) opisujeta protokol parenteralnega dajanja vitamina D_3 v odmerku 2 x 10^7 I.E. 2-krat na dan zadnjih 5 dni do pričakovanega poroda in še en dan po telitvi kot preventiva bolezni. O 80% učinkovitem preprečevanju poporodne pareze brez komplikacij pri kravah pasme Jersey poročajo tudi iz Slovenije, ko so aplicirali 0,4 g kristalinične oblike vitamina D_3 ali 10 milijonov I.E. vit. D_3 parenteralno 5 dni pred predvideno telitvijo s ponovitvami aplikacije vsakih 5 dni do poroda, če se je telitev zavlekla (Gregorović in sod., 1967). Littledike in Horst (1980) poročata o dobrih uspehih pri preventivi hipokalcemične pareze z dajanjem 10 milijonov I.E. vitamina D_3 10 do 14 dni pred telitvijo. Podobne rezultate predstavljajo tudi Goff in sod. (1988).

Dobre uspehe opisujejo tudi v raziskavi, kjer so dajali per os rastlino *Solanum glaucophyllum*, ki vsebuje veliko glikozidne oblike 1,25-$(OH)_2D_3$, ki jo vampova mikroflora učinkovito razcepi v aktivno obliko. Krave, ki so dobivale omenjeno rastlino pred porodom in še 14 dni po porodu, so bile dosti manj časa hipokalcemične kot kontrolne (Horst in sod., 2003b).

Dajanje nižjih doz 0,5 do 1 milijon I.E. je kontraindicirano, ker zavre izločanje PTH in nastajanje kalcitriola v ledvicah. Krave so v tem primeru postale močno hipokalcemične, čim se je zunanji vir vitamina D porabil. V nekaterih primerih so krave rabile celo teden dni, da so ponovno vzpostavile lastno sintezo kalcitriola (Littledike in Horst, 1980).

Dobre rezultate opisujejo pri parenteralnem dajanju umetnih analogov vitamina D, npr. 24-F-1,25-$(OH)_2D_3$ (Goff in sod., 1988), 25$(OH)D_3$ in 1α$(OH)D_3$ (Murray in sod., 2008). V Izraelu se 1α$(OH)D_3$ tudi komercialno uporablja (Sachs in sod., 1987).

Obstaja tudi nekaj zadržkov pri uporabi vit. D_3 za preventivo obporodne pareze. Težko je natančno napovedati točen datuma telitve, ker je najučinkovitejša aplikacija 1 do 4 dni pred porodom (Sachs in sod., 1987), oz. 3 do 6 dni pred telitvijo (Murray in sod., 2008). Bar in sod. (1980) so težavo zelo uspešno rešili s hkratnim dajanjem 5 mg flumethasona ob umetnem analogu vitamina D, kar je sprožilo telitev še v času učinkovanja danega vitamina. V omenjeni raziskavi sta po telitvi oboleli le 2 od 77 tretiranih krav. Težavo lahko predstavlja tudi obrok, ki je prereven s Ca pred in po porodu, saj se v tem primeru učinkovitost preventive ne bo dobro izkazala (Goff in sod., 1988). Drug problem predstavlja previsoko odmerjanje metabolitov vit. D_3, katerega posledica je hiperkalcemija in lahko metastatična kalcifikacija mehkih tkiv (Littledike in Horst, 1982). Končno je lahko problematična tudi nagla prekinitev dajanja visokih doz vitamina D_3, saj umetno povzročena hipervitaminoza blokira naravno nastajanje vitamina D_3. Po porabi umetno danega vitamina D_3 lahko zato pride do njegovega pomanjkanja in hipokalcemije (Horst in sod., 2003a).

2.5 MAGNEZIJ (Mg) PRI GOVEDU

Pomanjkanje Mg je precej pogosto pri prežvekovalcih, ker rezerve Mg v organizmu, ki bi se lahko učinkovito izrabljale, ne obstajajo. Povzroča lahko akutno ali kronično potekajočo obolenje, je pa tudi eden od vzrokov nenadne, nepojasnjene smrti pri prežvekovalcih. Že desetletja je znano, da pomanjkanje Mg pri govedu, pa tudi ovcah in kozah povzroča tetanije. Tetanije se kažejo z različnimi kliničnimi znamenji: razdražljivostjo, škrtanjem z zobmi, pretiranim slinjenjem, ataksijo, ležanjem in tetaničnimi mišičnimi krči (Martens in Schweigel, 2000). Mg je v živalski krmi praviloma dovolj. Z intenzifikacijo pridelave trave za krmo prežvekovalcev, ki zahteva velike količine kalijevih in dušikovih gnojil, se zmanjšuje absorpcija Mg iz krme in hkratnim poviševanjem proizvodnje mleka pri prežvekovalcih, je postala problematika hipomagneziemij aktualna. Na letni ravni prizadenejo hipomagneziemije okoli 0,5% mlečnega goveda v britanskih čredah, v posameznih čredah pa lahko doseže delež prizadetih živali kar 10% (Foster in sod., 2007).

2.5.1 FUNKCIJE MAGNEZIJA V ORGANIZMU

Mg je esencialni mineral, ki je četrti najbolj razširjen v organizmu in predstavlja 0,05% telesne teže prežvekovalcev (npr. 600 kg krava ga vsebuje 300g) (Foster in sod., 2007). Količina Mg v telesu krave narašča linearno z njeno težo, po formuli y=0,655x – 3,5, pri čemer je y g Mg v telesu in x telesna teža živali v kg (Martens in Schweigel, 2000). V celicah pa je po količini drugi za kalijem. Šestdeset do sedemdeset % se ga nahaja v kosteh, 30 – 40% v mehkih tkivih in samo do 1,0% v izvencelični tekočini (tudi v cerebrospinalnem likvorju) (Underwood in Suttle, 1999). V izvencelični tekočini odrasle krave je tako le 2 do 3 g Mg (Martens in Schweigel, 2000). V krvni plazmi pa ga je le 0,5% celotnega telesnega, kar je okoli 1,5 g pri 600 kg kravi (Foster in sod., 2007). Njegova fiziološka serumska koncentracija pri govedu je 0,69 – 1,23 mmol/L (Jazbec, 1990). Sedemdeset % Mg v krvi je v prosti ionizirani obliki, ki je aktivna, ostali pa je vezan na beljakovine, predvsem albumine. Ostala 0,5% Mg se nahaja v cerebrospinalni tekočini, očesni tekočini in drugih izvenceličnih tekočinah (Foster in sod., 2007). Izvencelični magnezij je nujen za normalno rast kosti in vzdrževanje kostnega metabolizma. Nedavno so ugotovili, da tudi regulira membranske kanalčke in mudulira nevromuskularno transmisijo oz. aktivnost (Martens in Schweigel, 2000). S tem, ko se veže na fosfolipide, je pomemben tudi za integriteto oz. stabilizacijo membran (Fontenot in sod., 1989). Mg v celicah je vključen v metabolizem maščob, beljakovin, ogljikovih hidratov in nukleinskih kislin (Walker, 1986). Številni encimi, ATPaze, kinaze, transferaze in fosfataze, ga potrebujejo kot kofaktor za aktivacijo (Martens in Schweigel, 2000). Potreben je tudi za zvijanje nukleinskih kislin oz. združevanje ribosomov (Fontenot in sod., 1989).

2.5.2 NARAVNI VIRI MAGNEZIJA

Količina Mg v rastlinah je odvisna od vrste rastline, tal in klime. V zmernem podnebju so metuljnice bogatejše z Mg (2,6 g Mg /kg SS) od trav (1,8 g Mg /kg SS) (Underwood in Suttle, 1999). Za prežvekovalce večina trav v zmernem podnebju ne vsebuje zadostne ali pa le mejno količino Mg. Predvsem v spomladanskem času mlade, hitro rastoče rastline vsebujejo nižje količine Mg (Martens in Schweigel, 2000). Sveže in konzervirane rastline vsebujejo približno enako količino Mg. Slama ga vsebuje malo, križnice pa podobno količino kot trave (Underwood in Suttle, 1999).

Koncentrati se zelo razlikujejo po vsebnosti Mg, tako vsebujejo žitno zrnje od 1,1 do 1,3 g, moka iz semen oljaric 3,0 – 5,8 g in ribja moka od 1,7 – 2,5 g/kg SS (Underwood in Suttle, 1999). Koncentrati iz kostne moke vsebujejo veliko magnezija.

2.5.3 METABOLIZEM MAGNEZIJA

Metabolizem Mg, za razliko od metabolizma Ca ni reguliran s specifičnimi hormoni in povratnimi zvezami. Magnezij, ki je naložen v kosteh, ni dostopen ob njegovem pomanjkanju v krvi in drugih tkivih. Zato je količina Mg v izvencelični tekočini odvisna od:

- absorpcije Mg skozi gastrointestinalni (GI) trakt,
- potreb organizma: tkiva, proizvodnja mleka, endogena sekrecija (z iztrebki),
- ekskrecija skozi ledvice: ko se preseže ledvični prag v krvi, 0,92 mmol/L, se vsi viški izločijo po tej poti (Ebel in Gunther, 1980), pri odraslih prežvekovalcih se ga mala količina izloči tudi skozi črevo (Greene in sod., 1983).

Absorpcija Mg

Glavna mesta absorpcije Mg pri prežvekovalcih so predželodci, v največji meri sluznica vampa, drugače pa tudi prebiralnik (Axford in sod.,1975; Tomas in Potter, 1976). Absorptivna sposobnost za Mg v organskih spojinah, npr. v žitih, je pri prežvekovalcih približno za pol manjša kot pri neprežvekovalcih; le približno 35% zaužitega se absorbira. V anorganski obliki se npr. MgO bolj učinkovito absorbira, in sicer okoli 50%. Razen tega številni dejavniki v zvezi z obrokom povzročajo motnje pri absorpciji Mg v predželodcih in privedejo do hipomagneziemije (Underwood in Suttle, 1999). Kompenzatorne absorpcije v črevesu ni (Tomas in Potter, 1976). Povezava med absorpcijo v predželodcih je linearna s količino zaužitega Mg, in sicer je pri kravah $y = 0,45x – 2,51$, $r = 0,89$, pri čemer je y absorpcija v predželodcih v g/dan, x pa je količina zaužitega Mg v g/dan (Martens in sod., 1987). Ker seka premica y os na negativni strani, to pove, da mora biti za kakršno koli absorpcijo presežena spodnja meja zaužitega Mg, ki je pri kravah 5,6 g/dan. Absorpcija Mg poteka transcelularno in paracelularno. Transcelularno naj bi absorpcija potekala v odvisnosti od razlike potencialov na apikalni in bazolateralni celični membrani, pa tudi neodvisno od te razlike. Tako naj bi en sistem deloval bolj ob nizkih, drugi pa ob visokih količinah zaužitega Mg (paracelularno; je tudi neodvisno od koncentracije K) (Martens in Schweigel, 2000). Skozi bazolateralno membrano prehaja v medceličnino s sekundarnim aktivnim transportom z Na/Mg izmenjevalcem. Paracelularna absorpcija je pasivna in nepomembna zaradi slabe

permeabilnosti (Schweigel in sod., 2000). Ko pH vampove vsebine naraste nad 6,5, postane Mg zelo slabo topen, ker se veže z rastlinskimi nenasičenimi maščobami (palmitinsko, linolensko in linolno kislino) v netopne Mg soli. Prav tako dobro se veže z metabolitom rastlinske trans akontske kisline, trikabalilatom, ki je v vampu netopen in lahko povzroči hipomagneziemijo (Cook in sod., 1994)

Pred odstavitvijo teleta in jagnjeta večino Mg absorbirata skozi črevo. Šele ko pride do prežvekovalske prebave, se absorpcija iz črevesja preseli v predželodce (Martens in Schweigel, 2000). Nekaj absorpcije skozi debelo črevo pa ostane tudi pri odraslih (Meyer in Busse, 1975). 1,25-$(OH)_2D_3$ stimulira resorpcijo Mg v GI traktu in stimulira njegovo izločanje skozi ledvice (Fontenot in sod., 1989).

V krvnem serumu je Mg vezan na serumske beljakovine in prost, ioniziran. Na njegovo koncentracijo v krvnem serumu indirektno vplivajo hormoni, ki regulirajo Ca metabolizem, aldosteron, tiroksin in inzulin (Underwood in Suttle, 1999).

Mg v kosteh

Mg se v glavnem nahaja v hidracijskem ovoju hidroksiapatita in se lahko mobilizira ali vgrajuje na to mesto (Baker in sod., 1979). Kadar se iz kosti mobilizirata Ca in aP, se sigurno mobilizira tudi Mg, zato prihaja tudi do očitnih nihanj rezerv Mg v kosteh med laktacijo. Prav zaradi tega pa kostno tkivo predstavlja zelo slabo rezervo Mg. Pri starejših kravah je zaradi manj intenzivnega metabolizma kosti tudi koncentracija Mg v krvi nižja kot pri mlajših. Pri teletih, ki so dolgo časa uživala z Mg deficitaren obrok, se je količina kostnega Mg zmanjšala, razmerje med Ca in Mg pa zvečalo s 50 : 1 na 150 : 1 (Underwood in Suttle, 1999). PTH zavira izločanje Mg skozi ledvice in stimulira razgradnjo kostnine ter tako posledično dviguje koncentracijo Mg v izvencelični tekočini (Fontenot in sod., 1989).

2.5.4 VPLIV PREHRANE NA METABOLIZEM MAGNEZIJA

Na absorpcijo Mg iz predželodcev negativno vpliva predvsem povečana količina zaužitega K (Greene in sod., 1983; Fontenot in sod., 1989; Dalley in sod., 1997a). Če je v suhi snovi namesto 1% K, 2% K, se bo prebavljivost Mg s 25% znižala na 15%, če pa se koncentracija K poviša iz 2 na 3 %, se bo prebavljivost dodatno zmanjšala le še za 4%. Višje koncentracije imajo verjetno še manjši dodatni doprinos k zmanjšanju prebavljivosti. Visoka koncentracija K v vampovi vsebini depolarizira apikalno membrano vampovega epitelija in tako zmanjša

električni gradient, ki je potreben za absorpcijo Mg. Ta negativni učinek se z dodatkom Na v obrok ne da kompenzirati (Martens in Käsebieter, 1983).

Opazili so, da tudi nizka koncentracija Na v obroku povečuje pojavljanje hipomagneziemije (Martens in Schweigel, 2000). Mehanizem je bil ugotovljen, in sicer povzroča nizka koncentracija Na povečano izločanje aldosterona, ta pa povzroči zmanjšanje koncentracije Na in zvišanje K v slini ter posledično tudi v vampovi tekočini. Učinek je enak kot pri visoki koncentraciji K v obroku (Martens in sod., 1987).

Če pride tudi do povišane koncentracije K v krvi, to sproži večje izločanje inzulina pri kravah in ovcah (Lentz in sod., 1976; Rabinowitz in sod., 1984), inzulin pa znižuje koncentracijo Mg v plazmi (Miller in sod., 1980).

Visoka koncentracija Na v obroku tudi pospeši izločanje Mg skozi ledvice (Moseley in Jones, 1974).

Nenadno povišanje amoniaka v vampu (z zaužitjem večje količine krme z visoko vsebnostjo prebavljivih beljakovin ali nebeljakovinskega dušika) zmanjša sposobnost absorpcije Mg (Martens in sod., 1988). Če taka prehrana traja dlje časa, pa pride do adaptacije in normalne absorpcije v 3 dneh (Martens in Schweigel, 2000). To se zgodi, ko gredo živali z zimskega obroka na mlado pomladansko pašo (dvig vampovega pH in amoniaka).

Povečanje zaužite energije v obroku pa zvišuje absorbcijo Mg (Fontenot in sod., 1989). Verjetno gre za boljše delovanje transporterja, ki je neodvisen od gradienta potenciala skozi sluznico vampa (Martens in Schweigel, 2000).

Tudi pH vampovega soka vpliva na absorpcijo Mg. Pri nižjem pH (zadosti lahko topnih ogljikovih hidratov v obroku) je Mg bolje topen in tudi vampov epitelij ga je v takih razmerah sposoben bolje absorbirati. Dalley in sod. (1997b) poročajo o zmanjšanju topnosti z 80% na 20%, ko se je in vitro dvignil pH s 5,0 na 7,0.

Visoka koncentracija Al v zeleni krmi je včasih povezana z večjo incidenco hipomagneziemij, vendar mehanizem vpliva Al na metabolizem Mg ni pojasnjen (Fontenot in sod., 1989).

Ugotovili so, da mlada, bujno rastoča trava vsebuje veliko vlage, kar povzroča hitrejšo pasažo skozi vamp in posledično zmanjšano možnost absorpcije Mg (Foster in sod., 2007).

Ugotovili so, da dodajanje maščobe v obrok za molznice, kot vira energije, lahko povzroča težave pri oskrbi z Mg. Vzrok je v tem, da lahko Mg tvori z maščobnimi kislinami mila, kar onemogoči njegovo absorpcijo v vampu. Posledica tega je lahko hipomagneziemija (Goff, 2004).

Na koncentracijo Mg v plazmi vpliva tudi kakršenkoli stres, ki povzroči izločanje adrenalina ali noradrenalina. Oba namreč znižujeta raven Mg v krvni plazmi (Martens in Schweigel, 2000).

2.5.5 POTREBE PO MAGNEZIJU

Za vsak kg mleka s 4% mlečne maščobe se v mleko izloči 0,15 g Mg. Mleko vsebuje konstantno vsaj 0,3 mmol/L, kolostrum pa 0,1 g Mg /kg. S 17 kg mleka se tako izloči celotna količina izvenceličnega Mg (približno 2,5 g). Z urinom se ga ob normalnih razmerah pri 700-kilogramski kravi izloči 4 g/dan (ob hipomagneziemiji pa se lahko ta količina zniža na nič – zato je lahko urin dober pokazatelj oskrbljenosti živali z Mg (Martens in Schweigel, 2000)) in endogeno ga takšna krava izgubi v prebavila (slina, žolč, pankreasni sok) še 2,8 g/dan. Skupne endogene izgube pri prežvekovalcih so ocenili na 3,0 mg Mg/kg žive teže na dan (Foster in sod., 2007). Na koncu brejosti potrebuje plod približno 0,2 g Mg na dan (House in Bell, 1993). Iz navedenega lahko sklepamo, da mora žival zaužiti vsaj tako količino Mg, ki nadomesti endogene izgube in izgube zaradi prireje mleka ter rasti ploda, drugače pride do deficita. Problem predstavlja tudi zelo različna prebavljivost Mg v različnih vrstah krme. Količina K in surovih beljakovin močno vplivata na koeficient absorpcije Mg iz voluminozne krme, tako da se ta lahko tudi na istem travniku očitno spreminja. Hipomagneziemijo se lahko inducira še pri količini 1,7 g Mg /kg SS obroka, ko je bilo K 40 g/kg SS. Ammerman in sod. (1971) pa ugotavljajo, da je bilo za prebavo slabe voluminozne krme dovolj že 0,5 – 0,8 g Mg /kg SS, le da tu ni bila tako velika količina K v krmi.

Največje potrebe po Mg imajo zato hitro rastoče živali in tiste z visoko prirejo mleka. Najvišjo prirejo mleka imajo največkrat krave, ki so že v tretji ali višji laktaciji in pri katerih še metabolizem kostnega tkiva ni več tako aktiven kot pri mlajših živalih. Zato je prav ta kategorija molznic najbolj izpostavljena pomanjkanju (Foster in sod., 2007).

Vhlevljene živali potrebujejo polovico manj Mg od tistih na paši (Underwood in Suttle, 1999).

Glede na prebavljivost Mg in prirejo mleka morajo molznice dobiti nekje od 38,0 do 75,0 g Mg na dan. Krava, ki proizvaja 45 kg mleka na dan in požre okoli 27 kg suhe snovi, mora imeti v obroku vsaj 0,2% Mg v suhi snovi. Če obrok vsebuje preveč K in nebeljakovinskega dušika, lahko potrebe po Mg zaradi slabe resorpcije narastejo tudi do 0,3 ali celo do 0,35% v suhi snovi (NRC, 2001).

Nekateri avtorji priporočajo, da naj vsebuje obrok za visoko breje krave kar 0,4% Mg v suhi snovi (Goff, 2004).

2.5.6 POMANJKANJE MAGNEZIJA

Zaradi svoje vpletenosti v številne fiziološke procese povzroča pomanjkanje Mg celo paleto motenj, ki lahko potekajo od kronične subklinične oblike do akutne nenadne smrti. Najbolj izrazite, klasične akutne oblike hipomagneziemije so tetanije: pašniška, transportna, zimska in hlevska tetanija sesnih telet. Najbolj so hipomagneziemiji nagnjene krave na začetku laktacije. Pogostost hipomagneziemij se poveča, kadar so krave na zgodnji spomladanski in pozno jesenski paši, ko raste bujna mlada trava v hladnih pogojih ob obilici vlage. Take okoliščine ob močno gnojenem travniku s K in dušikom rade povzročijo izrazito manjšo vsebnost Mg v travah. Razen tega pa je absorpcija Mg zelo zmanjšana, če je v vampu prisoten prebitek K in dušika ob pH večjem od 6,5 ter pomanjkanju energije.

Značilna klinična znamenja hipomagneziemije nastopijo, ko se koncentracija serumskega Mg zniža pod 0,4 ali 0,5 mmol/L (Goff, 2006). Klinično je na začetku lahko prisotna potrtost in otopelost, ki ji sledita togost in nervozno obnašanje z visoko dvignjeno glavo in ušesi ter buljenjem. V tej fazi je gibanje živali togo, z visokimi koraki, opotekajoče. Opazi se lahko tudi trzanje obrazne muskulature in ušes. Žival lahko tudi v prazno žveči, se prekomerno slini ter trza s tretjo očesno veko. V nekaj urah do dneh lahko nastopijo hude konvulzije s tetaničnimi krči. Med konvulzijami žival leži na boku, vesla z nogami in škrta z zobmi. Če ne pride do zdravljenja, žival med enim od napadov krčev pogine, potem ko pade v komo. Smrtnost pri kliničnih oblikah hipomagneziemij je brez zdravljenja 30 ali več odstotkov (Smith, 2002; Foster in sod., 2007).

Bolezen lahko poteka tudi subklinično. V tem primeru je koncentracija Mg v serumu pod 0,6 mmol/L; mejne vrednosti so od 0,6 do 0,8 mmol/L (McCoy in sod., 1996). Povezana je s slabšo proizvodnjo od pričakovane za kravo, manjšo vsebnostjo mlečne maščobe v mleku, razdražljivostjo živali in slabšim apetitom (Whitaker in sod., 1985). Zadostno oskrbljenost krav z Mg najbolje preverimo, če približno 12 ur po telitvi izmerimo koncentracijo Mg v krvnem serumu. Koncentracija Mg pod 0,8 mmol/L je znamenje za nezadostno oskrbljenost živali v tem primeru (Goff, 2006).

Pomanjkanje Mg povzroča tudi slabšo motoriko prebavil, kar ima lahko za posledico slabši apetit in manjšo konzumacijo voluminozne krme pri kravah po porodu (Underwood in Suttle,

1999). Zmanjšana konzumacija krme povzroči znižanje mlečnosti. Zmanjšanje apetita pa še dodatno zniža količino zaužitega Mg, kar lahko privede v začaran krog.

Hipomagneziemija zmanjša odziv obščitnice na hipokalcemijo, kar povzroči nezadostno izločanja PTH glede na stanje ter tudi slabšo odzivnost tkiv (predvsem kosti, ledvic in črevesa) na PTH (Goff, 2000). Zato so živali s hipomagneziemijo nagnjene tudi k hipokalcemiji (Littledike in Goff, 1987). Pri parezah, ki niso vezane na porod, zato ob hipomagneziemiji pogosto najdemo tudi hipokalcemijo in hiperfosfatemijo (Smith, 2002).

Kronično pomanjkanje Mg povzroča slabo rast, bolehnost, anoreksijo, mišično nekoordinacijo. Tudi vampova mikroflora za normalno rast in funkcijo potrebuje Mg, zato pri hujšem pomanjkanju lahko pride do zmanjšane celulolitične aktivnosti pa tudi do indigestije (Underwood in Suttle, 1999).

Prizadene lahko tudi hitro rastoča sesna teleta, ki sesajo mleko, ki mu ni dodan Mg, npr. pri dojiljah na paši. Bolezen poteka kronično, znaki se lahko pojavijo v 2 tednih do 8 mesecih in se pogosto poslabšajo, če tele dobi drisko. Teleta so razdražljiva, pojavljajo se fascikulacije muskulature, toga hoja, neprestano premikanje, mahanje z ušesi, konvulzije, tetanični krčni in smrt (Foster in sod., 2007).

Hipomagneziemije se pojavljajo tudi pri malih prežvekovalcih, predvsem pri ovcah 2 do 8 tednov po jagnjitvi (med visoko laktacijo), posebej, če imajo dvojčke. Bolezen se klinično kaže s trzanjem muskulature (to je zaradi runa dobro vidno predvsem na obrazu in ušesih), tetaničnimi krči, konvulzijami, ležanjem in veslanjem ter smrtjo. Prizadete živali so lahko tudi hipokalcemične. Prizadeta so lahko tudi jagnjeta, kar se akutno izraža s togo hojo in tetanijima, kronično pa s slabim apetitom ter slabotnostjo (Foster in sod., 2007).

2.5.7 PREBITEK MAGNEZIJA

Zgornja tolerančna meja za Mg pri prežvekovalcih je 5 g/kg SS oziroma nad 0,5% SS (Underwood in Suttle, 1999). Blaga toksičnost pri bikcih se je pokazala šele pri 14 g/kg SS (Chester-Jones in sod., 1990). Znamenja toksičnosti so luščenje *stratuma corneuma* vampovih papil, pri večjih dozah pa temna diareja, huda degeneracija *stratuma corneuma* vampovih papil, slab mišični tonus, izguba kitnih refleksov in paraliza. Poveča se tudi verjetnost nastanka urolitov (Chester-Jones in sod., 1990). Urolitijaza je nevarna predvsem za ovne, še posebej, če so kastrirani.

2.5.8 GIBANJE SERUMSKE KONCENTRACIJE MAGNEZIJA MED LAKTACIJO IN PRESUŠITVIJO KRAV

V študiji, ki sta jo opravila Bigras-Poulin in Tremblay (1998) so bile prvi dan po porodu povprečne vrednosti serumskega Mg višje kot 7. dan, in sicer 1,01 ± 0,35 mmol/L oz. 0,95 ± 0,13 mmol/L. Riond in sod. (1995) poročajo, da je koncentracija serumskega Mg prvi in drugi dan po porodu zvišana.

2.6 OBPORODNA HIPOKALCEMIJA

Klinično zaznavna oblika hipokalcemije, obporodna pareza, najpogosteje nastane v času malo pred ali po telitvi. Obdobje od 3 tednov pred porodom do 3 tedne po porodu imenujemo pri kravah molznicah prehodno obdobje ali tudi obdobje tranzicije. V tem času pride do številnih adaptacijskih procesov v organizmu zaradi začetka laktacije, ki jih skupaj imenujemo homeoreza (Bauman in Currie, 1980). Homeoreza je proces, pri katerem prihaja do fizioloških adaptacij zaradi spremembe stanja v organizmu, npr. prehoda iz presušenega stanja v laktacijo. Številni metabolični procesi se morajo pri tem spremeniti, da žival uspe ohraniti homeostazo.

Hipokalcemija je povezana z naglim povečanjem porabe Ca za potrebe produkcije mleka na začetku laktacije, ki jih krava z absorpcijo Ca iz obroka in telesnih rezerv v okostju ne uspe zadovoljiti. S tem se poruši homeostaza Ca, pride do izrazitega znižanja koncentracije Ca v krvi, le-ta ne more več podpirati delovanja živčevja in mišičnine. Pri prizadetih kravah opazimo opotekajočo hojo, težko vstajanje, mišično slabotnost, ležanje in največkrat prenizko telesno temperaturo. Hipokalcemija predstavlja predispozicijo za številne druge obporodne bolezni. Obporodna hipokalcemična pareza je najpomembnejše obolenje zaradi pomanjkanja makroelementov v obdobju tranzicije pri molznicah.

Predvsem krave, ki so v času presušitve bogato krmljene s Ca, na primer v obroku dobivajo velik delež metuljnic ali lucerninega sena, pomanjkanja, ki nastopi ob porodu zaradi povečanih potreb, s svojimi otopelimi homeostatskimi mehanizmi ne morejo nadomestiti. Predvsem količina vitamina D in aktivnost obščitnice v času presušitve bistveno vplivata na pojavnost bolezni.

Bolezen je v Evropi prvič opisal Eberhard že 1793 leta v Nemčiji (Rosenberger, 1970). Vendar takrat etiologija bolezni še ni bila znana. Sumili so na različne vzroke, predvsem

septične, toksične narave. Hess (1905) je prvi objavil obsežno študijo o etiologiji in takratni terapiji puerperalne pareze. Prava etiologija bolezni pa je bila nakazana šele 1917 leta (Blendinger, 1917). Avtor je uspel PH pozdraviti z dajanjem infuzije $CaCl_2$. Šele leta 1932 pa je veterinar Little objavil članek, v katerem navaja, da imajo krave z obporodno parezo za 50% nižje vrednosti Ca od zdravih in da je odvisno od koncentracije Ca kako težka oblika bolezni se bo razvila (Murray in sod., 2008).

Bolezen predstavlja hud zdravstveni problem tudi v Sloveniji. Prva poročila o večjih škodah izvirajo že izpred leta 1960, ko so na velikih družbenih posestvih pri uvoženih jersejskih kravah ugotavljali tudi do 30% incidenco bolezni (Gregorović in Bekš, 1962). Trenutno se obolevnost za poporodno parezo v svetu in v Sloveniji giblje nekje med 2 in 10% glede na celotno populacijo krav (Fatur, 1994; Radostits in sod., 2007; Gašperlin, 2000; Houe in sod., 2001; Goff, 2008). Martens in Schweigel (2003) poročata o 4 do 6%, DeGaris in Lean (2008) pa o 0 do 10% incidenci obporodne pareze pri kravah molznicah. Houe in sod. (2001) poročajo o zelo visoki incidenci v posameznih rejah, ki dosega celo do 34%, v povprečju pa je v rejah po svetu med 5 in 10%. Pri teh izračunih se upoštevajo vse telitve, tudi mladih krav. Subklinična hipokalcemija je še dosti bolj razširjena v rejah mlečnega goveda. O njej govorimo, ko krave še ne kažejo kliničnih znakov pareze, vrednost celokupnega Ca v krvnem serumu pa imajo pod 2,0 mmol/L (Goff, 2000). Pri pašnem govedu na Novi Zelandijo so hipokalcemijo ugotovili kar pri 33% krav na dan poroda (Roche in sod., 2002). Iz ZDA pa poročajo o 50% incidenci (Goff, 2008).

2.6.1 EKONOMSKI POMEN BOLEZNI

Direktne izgube nastanejo zaradi zdravljenja PH in izpada produkcije mleka. Razen teh so pogosto prisotne še indirektne izgube, predstavlja PH predispozicijo za razvoj drugih boleznimi.

Krave s PH so nagnjene:

1. k težkim porodom zaradi mišične oslabelosti, ki onemogoča normalen potek poroda; predvsem druga in tretja faza poroda se bolj pogosto zavlečeta zaradi slabšega krčenja gladke in skeletne muskulature (Correa in sod., 1993; Houe in sod, 2001),
2. povečani verjetnosti nastanka izpada maternice po porodu (Risco in sod., 1984),
3. povečani verjetnosti zaostale posteljice po porodu (Curtis in sod., 1983; Houe in sod, 2001). Vlogo pri nastanku zaostale posteljice naj bi imel kortizol, ki se ob hipokalcemiji intenzivneje izloča (Goff, 1999).

4. povečani verjetnosti infekcij maternice po porodu (Erb in sod., 1985; Houe in sod, 2001),
5. počasnejši involuciji maternice in zmanjšani plodnosti po porodu (Jonsson, 1999),
6. povečani verjetnosti napenjanja vampa zaradi atonije (Goff, 2003; Hara in sod., 2003),
7. povečani verjetnosti nastanka dislokacije siriščnika (Massey in sod., 1993; Correa in sod., 1993; Hara in sod., 2003); krave s poporodno hipokalcemijo imajo kar 2,3 do 3,4 krat večjo verjetnost nastanka bolezni (Houe in sod., 2001),
8. veliko večji verjetnosti nastanka ketoze, zaradi manjše konzumacije krme (Correa in sod., 1993; Ostergaard in Gröhn, 1999); Houe in sod (2001) navajajo kar 1,3 do 8,9 krat večjo verjetnost nastanka ketoze pri kravah, ki so prebolele PH kot pri zdravih,
9. večji verjetnosti nastanka infekcij vimena zaradi manj učinkovitega zapiranja seskovega kanalčka (sfinktra) (Goff, 2003); Houe in sod. (2001) poročajo kar o 8,1 krat večji verjetnosti nastanka mastitisa pri hipokalcemičnih kravah v primerjavi z zdravimi,
10. večji verjetnosti nastanka drugih infekcijskih bolezni, ker hipokalcemija direktno zmanjšuje odziv obrambnih celic na antigen (Kimura in sod.,2006),
11. zmanjšani prireji mleka na začetku laktacije. V celotni laktacija pa imajo lahko, po navedbah nekaterih raziskovalcev, celo več mleka od tistih, ki niso obolele (Rajala-Schultz in sod., 1999; Gild in sod., 2008),
12. skrajšani življenski dobi v čredi in večji verjetnosti izločitve zaradi direktnih in indirektnih komplikacij hipokalcemije (Kossaibati in Esslemont, 1997; Goff, 2008; Houe in sod., 2001),
13. nastanku sindroma ležeče krave (Houe in sod., 2001),
14. hipokalcemija pri visokoproduktivnih kravah v 40 dneh po normalnem porodu zmanjšuje velikost ovulacijskih foliklov in njihovih rumenih teles, ko se vzpostavi ciklus po telitvi (Kamgarpour in sod., 1999).

Povprečni stroški hipokalcemične obporodne preze, ki upoštevajo vse dejavnike, vključno z bolj zgodno izločitvijo krav in večjo verjetnostjo drugih bolezni so ocenjeni kar na 300 evrov (Kossaibati in Esslemont, 1997).

2.6.2 PATOFIZIOLOGIJA IN PATOGENEZA HIPOKALCEMIJE

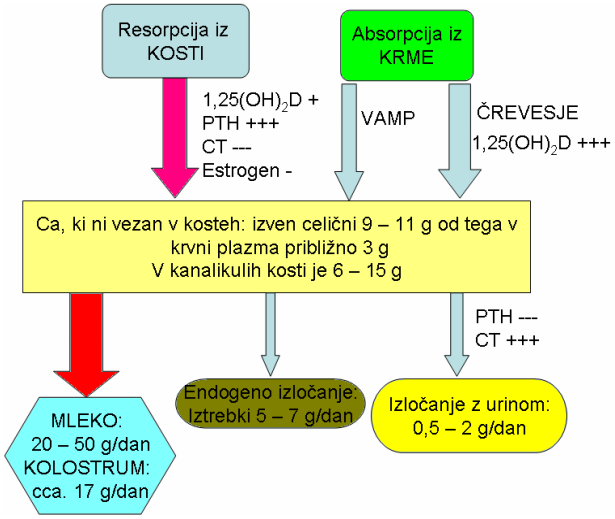
Povečanje potreb po Ca na začetku laktacije je za patogenezo obporodne hipokalcemije dosti bolj pomembno od samega poroda. Potrebe zgolj za prirejo mleka lahko presegajo 50 g Ca na dan, v povprečju pa okoli 30 g na dan pri molznicah z intenzivno prirejo mleka. To pomeni,

da mora krava z visoko prirejo mleka kar 20 ali večkrat potrošiti ves Ca v krvni plazmi samo za potrebe sinteze mleka (Goff, 2000). Pogosto predvsem starejše krave niso v tako kratkem času sposobne zadostno povečati resorpcije Ca, da bi zadovoljevale tako izrazito in naglo povišane potrebe po Ca zaradi prireje mleka, kar pri takih živalih povzroči smrtno nevarno akutno hipokalcemijo.

Pred telitvijo potrebuje tele za svojo rast le okoli 15 g Ca na dan, krava pa lahko zadosti potrebe v času presušitve že z 10 do 12 g absorbiranega Ca na dan (Allen in Sansom, 1993). Ob porodu pa lahko krava zadovolji potrebe po Ca le s povečanjem absorpcije Ca iz črevesja in povečanjem resorpcije iz tkiv, predvsem iz kostnega tkiva, saj so rezerve Ca v krvnem obtoku zelo majhne. Večina krav ima zato po telitvi vsaj do neke mere prisotno hipokalcemijo (DeGaris in Lean, 2008).

Določen vpliv, tako v smislu slabšega apetita kot tudi delovanja celotnega organizma v ožjem obporodnem obdobju, imajo tudi nagle spremembe v plazemski koncentraciji reprodukcijskih hormonov (progesteron, estrogen) in stresnih hormonov (adrenalin in kortizol).

Hipokalcemija povzroča tudi zmanjšanje izločanja acetilholina (ACH) in posledično atonično parezo (Rizzo in sod., 2008).



Shema 7: Bilanca Ca pri okoli 600 kg kravi, ki proizvaja od 20 do 50 l mleka na dan; + stimulira premikanje Ca v smeri puščice, - zavira premikanje Ca v smeri puščice (Goff, 2000)

Ugotovili so, da večina krav, ki zbolijo za obporodno hipokalcemično parezo, nima zmanjšane koncentracije vit. D_3 in PTH v krvi, ampak dostikrat celo zvišano koncentracijo vit. D_3, kar govori, da je verjetno problem tudi v tem, da v ciljnih celicah (v črevesju, kosteh in ledvicah) manjka receptorjev, ki bi morali sprožiti odgovor na ta dva hormona (Horst,

1986; Horst in sod., 1994; Smith, 2002). Zvišana koncentracija PTH in vit D_3 je normalen adaptacijski odgovor vsake krave na hipokalcemijo na začetku laktacije. Da pa se poveča resorbcija Ca skozi črevo je potrebnih približno 24 ur stimulacije z aktivno obliko vit. D_3. Po 48 urah delovanja PTH na kostno tkivo je prišlo do začetka povečane resorpcije kostnega tkiva (Horst in sod., 1994). Zato v večini primerov zadostuje enkratna intra venozna terapija poporodne pareze s Ca pripravki. Krave, ki imajo ponavljajoče epizode parez, pa imajo znižano koncentracijo kalcitriola v krvi; pri njih gre najverjetneje za motnjo pri odgovoru ledvic na stimulacijo s PTH (Horst, 1986). Ugotovljeno je bilo tudi, da starejše krave slabše absorbirajo Ca iz črevesja (vzrok je najverjetneje zmanjšano število receptorjev za vit. D) (Horst, 1986; Goff, 2000). Enako se dogaja tudi s številom receptorjev v osteoblastih. Lappeteläinen in sod. (1993) so ugotovili, da je metabolična aktivnost kosti pri kravah z obporodno parezo v primerjavi z zdravimi kravami v obporodnem obdobju nižja. Vsi kazalci, aktivnost celokupne alkalne fosfataze in koncentracija osteokalcina, kot kazalcev osteoblastne aktivnosti, ter koncentracija hidroksiprolina, kot kazalca osteoklastne aktivnosti v krvnem serumu, so bili znižani pri kravah z obporodno parezo v primerjavi s kravami, ki niso obolele.

2.6.2.1 DEJAVNIKI, KI PRIPOMOREJO K POJAVU OBPORODNE HIPOKALCEMIČNE PAREZE IN NAM POMAGAJO PRI ZGODNJEM ODKRIVANJU OGROŽENIH KRAV

Dejavniki, ki predisponirajo k nastanku PH in nam pomagajo oceniti verjetnost, da bodo krave obolele:

- **metabolična alkaloza** povzroča, da se tkiva slabše odzivajo na PTH (Gaynor in sod., 1989); predvsem v kostnem tkivu se ne more učinkovito uporabiti Ca, ki je v tekočini kanalikulov, hkrati pa tudi osteoklastična aktivnost poteka manj intenzivno, v ledvicah ni učinkovite reabsorpcije Ca iz glomerularnega filtrata in tudi nastajanje 1,25-$(OH)_2D_3$ je moteno (Goff, 2008); v največji meri je posledica obroka, ki vsebuje prebitek kationov. Pomen metabolične alkaloze v etiologiji PH potrjuje tudi raziskava, v kateri so z bolj natančnim merjenjem pH urina pred telitvijo uspešno napovedali, ali bo krava po telitvi dobila PH. V pH urina se namreč odraža tudi kislinsko bazno ravnotežje organizma (Seifi in sod. 2004).
- **hipomagneziemija**, koncentracija serumskega Mg < 0,65 mmol/L povečuje verjetnost obporodne hipokalcemične pareze (van de Braak in sod., 1987b), tako da zmanjšuje

izločanje PTH ob nastopu hipokalcemije (Littledike in Goff, 1987). Hkrati pomanjkanje Mg tudi zmanjšuje odzivnost tkiv na PTH, ker imata tako adenilat ciklaza kot fosfolipaza C, preko katerih se izraža učinek vezave PTH na svoj receptor v tkivih, mesto za vezavo Mg^{2+} (je kofaktor pri omenjenih encimih), ki mora biti zasedeno, da encima polno delujeta (Rude, 1998). Idealno mora biti vsebnost Mg 24 do 48 ur pred porodom v krvnem serumu molznic 0,8 – 1,3 mmol/L (Whitaker, 1997); Mulligan in sod. (2006) priporočajo merjenje serumske koncentracije Mg v zadnjem tednu pred telitvijo,

- **hiperfosfatemija**, koncentracija aP > 1,9 mmol/L neposredno negativno vpliva na aktivnost 1-alfa-hidroksilaze, ki v ledvicah pretvarja 25-hidroksivitamin D_3 v aktivnega 1,25-$(OH)_2D_3$ (Kichura in sod., 1982); priporoča se vsebnost P ≤ 0,3% v SS obroka za visoko breje krave (Mulligan in sod., 2006); Goff (2004) poroča, da že več kot 80 g zaužitega P znižuje nastajanje 1,25-$(OH)_2D_3$,
- **veliko Ca in aktivnega vit. D_3 v obroku** znižuje 1-alfa hidroksilazno aktivnost; ves Ca se v tem primeru absorbira po pasivni poti. Zniža se absorpcijska učinkovitost v črevesu in resorpcija Ca iz kostnega tkiva (Kichura in sod., 1982). Ugotovili so tudi visoko koncentracijo 24,25-dihidroksiholekalciferola (metabolit vit.D), ki spodbuja nastanek obporodne pareze (Barton in sod., 1984),
- krava je odvisna od stalnega dotoka Ca, zato predstavlja tudi **staza v prebavilih** (zaradi kateregakoli vzroka, npr. obporodne indigestije), ki zmanjša črevesno absorpcijo Ca, pomemben dejavnik tveganja za nastanek obporodne pareze (Huber in sod., 1981),
- pri kravah, **starejših od 30 mesecev**, so ugotovili nižje vrednosti serumskega Ca kot pri mlajših (Peterson in Walderen, 1981). S starostjo živali se zmanjšuje število receptorjev v ciljnih celicah, tako za PTH kot tudi za kalcitriol (Horst in sod., 1990). Mlade živali (prvesnice) zato skoraj nikoli ne zbolijo za hipokalcemično parezo. Po izračunu DeGarisa in Leana (2008) se verjetnost hipokalcemične obporodne pareze z vsako laktacijo poveča za 9%,
- **telesna kondicija**, krave, ki imajo kondicijo BCS več kot 3,5 (na lestvici od 1,0 do 5,0), imajo večjo verjetnost nastanka hipokalcemije, krave z oceno nad 4, pa so kar 4,3 krat pogosteje obolele za PH od tistih s priporočeno kondicijo, ugotavljajo Heuer in sod. (1999) v raziskavi na šestnajstih čredah molznic. Podobno poroča tudi Guterbock (2004),

- **pasma**, molznice pasem iz Kanalskega preliva so bolj dovzetne od holštajn frizijske pasme (Harris, 1981). Lean in sod. (2006) poročajo celo 2,25 krat večji verjetnosti, Roche in Berry (2006) pa celo o 4 do 5 krat večji verjetnosti bolezni pri jersey pasmi kot pri holštajn frizijski. Pasme iz kanalskega preliva naj bi imele manj receptorjev za 1,25-$(OH)_2D_3$ v črevesu (Goff in sod., 1995),
- **prireja mleka**, krave z višjo mlečnostjo imajo večjo verjetnost, da zbolijo (Curtis in sod., 1984); mastektomirane krave, za razliko od kontrolne skupine nemastektomiranih, v poskusu niso obolele (Goff in sod., 2002),
- **klimatski dejavniki**, večja evaporacija, nižja temperatura trave, večje nihanje temperature zraka, večja količina dežja povečujejo verjetnost bolezni pri kravah na paši (Roche in Berry, 2006). Ekstremni klimatski dejavniki (npr. huda vročina ali mraz) imajo verjetno posreden vpliv preko zmanjšane konzumacije krme (Sanchez in sod., 1994; West, 2003; Rhoads in sod., 2009).

2.6.3 KLINIČNA SLIKA BOLEZNI

Najpogosteje obolevajo krave molznice v ožejm obporodnem obdobju, večinoma znotraj 3 dni okoli dneva poroda. V drugih fizioloških obdobjih krave redko zbolevajo (Roche in Berry, 2006). Klinično lahko bolezen opredelimo v več stopenj.

1. stopnja: serumska koncentracija tCa je med 1,4 in 1,9 mmol/L (5,5 – 7,5 mg/dL)

- Krava lahko še stoji, kaže znamenja preobčutljivosti in razdražljivosti (razburjenosti).
- Opazimo lahko striženje z ušesi, nežni tremor bokov, nekoliko ataktično hojo, mahanje z repom, prestopanje, nemir, lahko škrtanje z zobmi, brcanje pod trebuh, lahko mukanje in dihanje z odprtim gobcem ter iztegnjenim jezikom. Največkrat bolezen zelo hitro, nekje v eni uri, preide v 2. stopnjo.
- Ta stopnja lahko poteka tudi brez vidnih kliničnih znakov in ji zato lahko rečemo »subklinična hipokalcemija«. Vendar pa ima tudi subklinična negativen učinek na delovanje gladke muskulature in živčevja (Houe in sod., 2001).

2. stopnja: serumska koncentracija tCa je med 0,9 in 1,6 mmol/L (3,5 – 6,5 mg/dL)

- Živali ne morejo več stati, obležijo in kljub poskusom vstajanja ne morejo več vstati. Zelo značilno je ležanje v sternalnem položaju.
- Opazimo lahko otožnost, anoreksijo, suh smrček, hipotermijo (T < 38,0° C), hladne okončine in uhlje (v primeru, da je T okolja nad 38° C ali če krava obleži na soncu, je lahko prisotna hipertermija) ter blag tremor muskulature.

- Ugotovimo lahko tahikardijo in slabo slišna srčna tona. Jugularni veni sta upadli.
- Nastopi gastrointestinalna staza (odsotnost vampovih kontrakcij, napenjanje, prenehanje iztrebljanja, pičli in suhi iztrebki, izguba analnega tonusa) in tudi uriniranje je onemogočeno.
- Zelo pogosto pride do zaostale posteljice.
- Krava se slabo odziva na zunanje dražljaje, tudi pupilarni in analni refleks sta slabotna ali odsotna.
- Največkrat imajo sternalno ležeče krave glavo prislonjeno k telesu, če pa jo iztegnejo, se opazi rahla upognjenost glave in vratu, ki ji rečemo tudi S-asta drža glave in vrata, s katero se žival upira ležanju na boku.
- Pri kravah v tej stopnji pareze obstaja večja verjetnost izpada matrnice.
- Ta stopnja traja največkrat od 1 do 12 ur.

3. stopnja: serumska koncentracija tCa je manj kot 0,9 mmol/L (<2,0 mg/dL)

- V tej stopnji živali začno izgubljati zavest in na koncu padejo v komo.
- Značilni so popolna izguba tonusa muskulature, krava se neha odzivati na boleče dražljaje in leži na boku.
- Prisotna sta močno napenjanje vampa in gastrointestinalna staza.
- Pulza se skoraj ne da tipati, frekvenca srca naraste do 120 udarcev/minuto, srčna tona pa sta zelo slabo slišna. Zelo velika je verjetnost nastanka aspiracijske pljučnice. Brez takojšnje veterinarske intervencije prizadete krave v nekaj urah poginejo.

Krave, ki imajo puerperalno parezo, so bolj nagnjene k drugim boleznim obporodnega obdobja (Oetzel, 1988; Curtis in sod., 1983).

Tabela 2: Verjetnosti nastanka drugih bolezni pri kravah (n=2190), obolelih za obporodno parezo (Curtis in sod., 1983)

INCIDENCA	Distocija	Zaostala posteljica	Leva dislokacija siriščnika	Ketoza	Mastitis
PH=4,3 %	6,5**	3,2**	3,4*	8,9**	8,1**

**: $p < 0,0001$; *: $p < 0,06$

2.6.4 DIAGNOZA BOLEZNI

Diagnoza bolezni temelji na značilni klinični sliki. Če bi žival pred zdravljenjem pustili dolgo ležati (4 do 6 ur), lahko to zaradi teže živali privede do hudih poškodb muskulature in živcev, kar bi močno poslabšalo prognozo bolezni. Za krave, ki kljub terapiji s kalcijem, ne vstanejo, mentalno pa so bistre ter jedo in pijejo, pravimo, da imajo sindrom ležeče krave. Krave s sindromom ležeče krave zahtevajo intenzivno nego, prognoza za ozdravitev pa je pri njih dosti slabša kot pri kravah s PH (Radostits in sod., 2007). Zaradi tega moramo PH čim prej zdraviti, uspešnost terapije pa nam bo potrdila diagnozo. Krave s PH praviloma zelo hitro reagirajo na i.v. zdravljenje s Ca pripravki.

Diagnozo lahko potrdimo z biokemijsko preiskavo krvnega seruma, kjer koncentracija celokupnega Ca < 2,0 mmol/L kaže na hipokalcemijo (Goff, 2000; Oetzel, 2004). Za ugotavljanje subklinične hipokalcemije merimo serumski Ca 12 do 24 ur po telitvi (Oetzel, 2004). Klinično izražena hipokalcemija praviloma nastopi, ko se celokupni serumski Ca spusti pod 1,4 mmol/L.

Ca je v krvi prost, ioniziran, in vezan na albumine. Kadar je krava v metabolični alkalozi, se Ca bolje veže z albumini, zato lahko krave v alkalozi kažejo znamenja hipokalcemije kljub normalnemu skupnemu serumskemu Ca (Goff, 2000).

Pogosto imajo krave s hipokalcemijo tudi znižane vrednosti aP. Vzrok za ta pojav je veliko izločanja PTH zaradi hipokalcemije, ki povzroča intenzivno izločanje aP z urinom in slino. Vrednosti Mg so pri kravah s PH, ki so dobro oskrbljene s tem mineralom, zelo pogosto povišane. Tudi to povzroča PTH s svojim stimulirajočim delovanjem na resorpcijo Mg v ledvičnih tubulih in dvigom ledvičnega praga za ekskrecijo (Goff in sod., 1989). Zelo hitro po nastopu ležanja krave s PH se začne zaradi poškodb mišičnine, ki jih povzroča teža živali, poviševati aktivnost mišično specifičnega encima kreatin kinaza pa tudi AST. Stres, ki ga pri kravah povzroča PH, zelo pogosto povzroči nastanek hiperglikemije, hematološki izvid pa pokaže stresni levkogram, za katerega je značilna zrela nevtrofilija, limfopenija in včasih tudi eozinopenija ter monocitoza (Goff, 2000).

Koncentracije PTH in kalcitriola so pogosto višje pri kravah z obporodno parezo kot pri kravah, ki niso obolele (Horst in sod., 1978).

2.6.5 DIFERENCIALNE DIAGNOZE OBPORODNEGA LEŽANJA

Telitev predstavlja za krave rizično obdobje za nastanek raznih zapletov, ki lahko povzročijo ležanje krave po porodu. Kadar se soočimo s kravo, ki je po telitvi obležala, moramo izključiti tudi naslednja stanja:

- distocia in z njo povezane poškodbe rodil, izkrvavitev, mehkih tkiv področja medenice (npr. paraliza *n. obturatoriusa*) ter same medenice,
- poškodbe zaradi padcev: zlomi, zvini, pretres možganov, udarnine muskulature, miopatije,
- toksična/toksemična in septična stanja: razna vnetja v tem obdobju, še posebej, če se sprošča endotoksin, kot so toksemični mastitis, toksemični metritis, enteritis, listerioza, peritonitis, nefritis, encefalitis, sindrom debele krave. Septična stanja so znana tudi po tem, da lahko sprožijo akutno hipokalcemijo, še posebej, kadar se sprošča tudi endotoksin. Vrednosti celokupnega Ca v krvnem serumu so v teh primerih največkrat med 1,5 in 2,0 mmol/L in so posledica redistribucije Ca v organizmu (Goff, 2008),
- metabolične motnje: razen PH pogosto povzroča ležanje tudi sindrom debelih krav oz. zamaščenih jeter, hipofosfatemija (značilno zanjo je, da so krave mentalno normalne - ni zaspanosti ali potrtosti - in imajo apetit), hipokalemija (pogosto nastopi ob pretirani rabi glukokortikosteroidov kot terapije ketoze), hipomagneziemija,
- akutne indigestije in zastrupitve, npr. akutna vampova acidoza, zastrupitve z etilen glikolom, bakrom, kuhinjsko soljo, organofosfati,
- bolezni notranjih organov, npr. pljučna krvavitev, obstrukcija žolčevodov, fascioloza, bolezni srca, tumorji,
- bolezni okončin in parkljev, npr. akutni pododermatitis, artritis,
- gastrointestinalni incidenti, npr. ruptura siriščnika, ileus.

Pri živalih, ki so obolele za PH, je pomembno, da ugotovimo, če slučajno ob PH vzporedno potekajo tudi druge bolezni. Uspešnost terapije se izrazito zniža, kadar vzporedno potekajoče bolezni spregledamo. Hkrati pa moramo, predvsem kadar imamo opravka z infekcijami, kot so mastitis in metritis, pri katerih je prisotna tudi večja količina endotoksinov, pomisliti tudi na veliko verjetnost sekundarnega nastanka hipokalcemije.

2.6.6 TERAPIJA

Nujna je čim hitrejša terapija, še posebej, če krava leži. Do hude ishemije ter posledično nekroze mišic in živcev, na strani na kateri krava leži, lahko pride že v 4 urah, kar povzroči sindrom ležeče krave (Radostits in sod., 2007).

1. stopnja: Damo lahko Ca preparate za p.o. uporabo. Ca se v tem primeru absorbira skozi steno vampa in v tankem črevesu. Pred aplikacijo Ca pripravkov za p.o. uporabo se moramo prepričati, da ima žival ohranjeno sposobnost požiranja.

Pripravki za p. o. uporabo so največkrat na osnovi Ca klorida (pasta, gel, drenč); $CaCl_2$ je kavstičen, sicer je zelo učinkovit. Dobi se ga v obliki paste, ki zmanjšuje njegovo kavstičnost, sicer ga moramo zelo razredčiti z vodo. Ca propionat se p.o. počasi absorbira in pogosto ne prepreči napredovanja bolezni v 2. stopnjo. Ca gel za p.o. uporabo je največkrat Ca propionat v gelu iz propilen glikola. Zelo se priporoča tudi uporaba Ca propionata v obliki praška za pripravo drenča. V tem primeru se 700 g praška raztopi v 20 L tople vode in aplicira po nazogastrični sondi. Prednost te raztopine je tudi, da hkrati s propionatom zdravimo še negativno energetsko bilanco oz. ketozo in kravo rehidriramo.

Približno 50g Ca vsebuje en p.o. odmerek, približno 4 g Ca pa se absorbira v kri.

Takoj lahko zdravimo tudi z i.v. Ca terapijo, vendar to pogosto povzroči ponovitev stanja.

2. in 3. stopnja: Kadar je prisotna izrazita timpanija vampa zaradi atonije, moramo rešiti najprej njo. Klasično terapijo PH predstavlja i.v. aplikacija 500 ml 23% Ca glukonata (ali Ca boroglukonat). Ca glukonat je Ca sol glukonske kisline, ki nastane po oksidaciji glukoze. V Ca glukonatu je Ca vezan z dvema molekulama glukoze, ki jima je v Ca boroglukonatu dodana še borna kislina. Največkrat je pakiran v 500 ml steklenicah, ki vsebujejo 8 – 12 g Ca, kar predstavlja en terapevtski odmerek za zdravljenje PH. Velike, težke krave potrebujejo še nekaj g Ca več. I.v. se priporoča dajati Ca pripravke s hitrostjo 1 g Ca na minuto. Nekateri priporočajo, da mora aplikacija trajati vsaj 4 minute, še bolje pa 10 ali več minut zaradi kardiotoksičnosti Ca. Ca povzroča aritmije in izrazito bradikardijo, ki lahko vodi v zastoj srca v sistoli. I.v. dajanje Ca zviša serumsko koncentracijo Ca nad normalno za okoli 4 ure (Goff, 2008). Šele, ko žival vstane in se vzpostavi normalen požiralni refleks, lahko damo še p.o. Ca preparate (glej pod 1. stopnja), da zmanjšamo verjetnost ponovitve stanja. Načeloma se p.o. terapija klinične PH odsvetuje. Z istim namenom lahko damo še 500 ml 23% Ca glukonata

s.c. na več mest. Na eno mesto se da lahko s.c 1 do 1,5 g Ca oz. 50 do 75 ml večine komercialnih pripravkov.

Priporočeni odmerek za terapijo PH je 2 g Ca / 100 kg t.t. ali 1ml 23% Ca boroglukonata /kg t.t. (Goff, 2008).

Obstajajo tudi Ca pripravki za i.m. dajanje, ki so pa zelo nepraktični, ker jih je potrebno dati na zelo veliko mest (Goff, 2008).

Kadar pride med i.v. aplikacijo Ca pripravkov do motenj delovanja srca, prenehamo s terapijo. Nadaljujemo, ko se ritem normalizira. Za preprečevanje aritmij se lahko aplikacira atropin i.v. v odmerku 0,05 mg/kg (deluje antiholinergično – parasimpatikolitično**)** ali 10% $MgSO_4$ v odmerku 100 do 400 ml i.v. (Goff, 2000). Nekateri pripravki že tovarniško vsebujejo Mg. Kot preventivo artimije lahko damo pred aplikacijo tudi kardiorespiratorne analeptike (npr. kofein).

O dobrem učinku zdravljenja, pri katerem so aplicirali 20% Ca boroglukonat v odmerku le 0,2 mL/kg v kombinaciji z 0,01 mg/kg naloksona (opioidni antagonist) i.v. poroča Sciorsci in sod. (2001). Nalokson (opioidni antagonist) preprečuje izločanje endogenih opioidov, predvsem β endorfinov, ki preko dveh poti inhibirajo izločanje acetilholina v sinapsah, kar ima za posledico odpoved nevro-muskularnega prenosa dražljajev in preprečitev krčenja mišice (parezo) (Rizzo in sod., 2008).

Dajanje glukoze je kontraindicirano – žival je praviloma zaradi bolezni, predvsem stresa, ki ga povzroča, že hiperglikemična, razen tega pa s hiperglikemijo le pospešujemo izločanje elektrolitov skozi ledvice.

Šestdeset odstotkov krav vstane kmalu po terapiji, 15% v 2 urah. Če v 8 – 12 urah krava ne vstane, jo je potrebno ponovno pregledati, oceniti staneje in ustrezno zdraviti. Kar 5 do 15% krav ne vstane po začetni terapiji. Če ne ugotovimo nič posebnega, lahko v 12-urnih intervalih do 3-krat zdravimo PH, večkrat pa se je zelo redko izkazalo kot uspešno. V teh primerih je smiselno začeti dodajati tudi pripravke s fosforjem, magnezijem in glukozo. Kar pri 10% krav lahko ob hipokalcemiji pričakujemo še katero od komplikacij (Radostits in sod., 2007). Pri takih kravah zelo pogosto pride do sindroma ležeče krave, to je sekundarne poškodbe

muskulature in živcev zaradi teže ležeče živali. Dvajset do 67% krav s sindromom ležeče krave pogine ali gre v zakol (Cox, 1982). Vzrok za to je pogosto lahko ne dovolj intenzivna nega ležeče krave. Ležeče krave zahtevajo mehko ležišče, obračanje vsaj 4x na dan, stalen dostop do vode in krme, molžo in zadovoljivo higieno. Nekateri avtorji poročajo o 76% verjetnosti ozdravitve, če žival leži 1 dan, 31%, če 2 dni, 31%, če 3 dni in le 19%, če 4 dni. Izkušnje drugih so boljše, saj je pri njih v 4 do 7 dneh vstalo okoli 50% krav. Kadar krava leži več kot 10 dni, je prognoza zelo slaba, čeprav so znani primeri, ko so krave vstale po dveh, treh ali celo več tednih (Andrrews, 1992).

Ponovne terapije s Ca se priporoča le na osnovi biokemičnega izvida, ker pretirano dajanje, moti homeostazo Ca.

Radostits in sod. (2007) opozarjajo, da lahko po že uspešni terapiji PH pričakujemo pri 25 – 30% krav ponovitev stanja znotraj 48 ur po prvem zdravljenju. Te krave zahtevajo ponovni pregled in ustrezno zdravljenje. Nekaj krav potrebuje celo 3 terapije do popolne ozdravitve. Krave, pri katerih se PH po terapiji ponovi, so zelo nagnjene tudi k sindromu ležeče krave.

Preventivni ukrepi proti ponovitvam obporodne hipokalcemične pareze so še:

- nepopolna molža (vsaj prve 3 dni),
- dajanje pripravkov za p.o. uporabo,
- insuflacija vimena,
- dajanje visokih odmerkov vitamina D_3 ob standardni terapiji.

2.6.7 PREVENTIVA BOLEZNI

Preventivne akcije je potrebno pričeti že pred koncem predhodne laktacije tako, da se krave presuši v ustrezni kondiciji. Posebej kritično obdobje v smislu preventive pred hipokalcemijo je zadnji mesec pred telitvijo (Mulligan in sod., 2006).

OMEJEVANJE KOLIČINE ZAUŽITEGA Ca PRED PORODOM

Namen te oblike preventive je, da se vzpostavi aktivna mobilizacije Ca iz okostja in aktivna absorpcija Ca iz črevesa že pred porodom. Na ta način je ob porodu in začetku laktacije, ko se potrebe izrazito povečajo, krava že sposobna intenzivne absorpcije Ca iz obroka in okostja. Pomembno pri tem je tudi, da krava po porodu dobi obrok bogat s Ca.

Kadar krava dobiva obrok, ki ne zagotovi dnevnih potreb po Ca, povzroči to negativno bilanco Ca. Zaradi tega se nekoliko zniža tudi vsebnost Ca v krvi, ki spodbudi izločanje PTH.

PTH stimulira resorpcijo kostnine in nastajanje 1,25-$(OH)_2D_3$. Ob porodu je zaradi tega aktivno že veliko osteoklastov, enterociti pa so že stimulirani z 1,25-$(OH)_2D_3$ in pripravljeni na intenzivno ter učinkovito absorpcijo Ca iz obroka. Ob nastopu močno povečanih potreb po Ca ob porodu se bodo te lažje zadovoljevale preko intenzivne resorpcije kostnine in absorpcije iz obroka, ki bo sedaj bogat s Ca (Greene in sod., 1981).

Priporočajo dajanje obroka z zelo majhno količino celokupnega Ca, pod 50 g na dan, še bolj idealno pa pod 20 g na dan zadnja dva tedna pred telitvijo. To predstavlja dobro preventivo PH, vendar pa je v praksi težje izvedljivo in ima lahko druge negativne učinke (Oetzel, 2000).

Če dobi z obrokom visoko breja, 700 kg holštajn frizijska krava več kot 22 g absorbiranega Ca na dan (kar predstavlja njeno dnevno potrebo po Ca), tak obrok statistično značilno ne zmanjšuje verjetnosti, da bi krava po porodu obolela za PH (Goff, 2000). Priporočajo obrok, ki vsebuje 10 do 30 g vsega Ca, da se izrazi omenjeni učinek (Goff, 2004). Obrok z nizko vsebnostjo Ca je najlaže pridobiti, če so živali na paši, ker je takrat konzumacija suhe snovi manjša in s tem tudi vsebnost Ca. Načeloma že 4 dni deficitarnega obroka s Ca sproži homeostatske mehanizme, ki bodo aktivno vzdrževali normokalcemijo (Goings in sod., 1974).

Ca v obroku za presušene krave naj ne bo več kot 0,45 % v SS; ta količina popolnoma oskrbi žival in ne predstavlja omejitve količine zaužitega Ca (NRC,2001). Mulligan in sod. (2006) priporočajo, da mora biti v obroku za presušene krave v ožjem predporodnem obdobju manj kot 30g Ca na dan, če hočemo na ta način preprečevati hipokalcemijo.

Krmljenje rastlin z znano veliko vsebnostjo Ca se pred porodom odsvetuje. Primer je lucernino seno (Underwood in Suttle, 1999).

Vsebnost kravam dostopnega Ca v obroku znižujejo eksperimentalno tudi z dodajanjem zeolita, ki ima lastnost, da veže Ca (Thilsing-Hansen in sod., 2003), ali rastlinskih olj, ki tvorijo s Ca netopna Ca mila (Wilson, 2003). Kot zelo obetaven način zniževanja vsebnosti Ca v obroku se je izkazal Zeolit A, to je Na Al silakat. Zeolit A ima sposobnost vezave s Ca v obroku v netopen kompleks, kar lahko bistveno zmanjša absorbcijo Ca iz obroka (Goff, 2006a).

ZADOSTNA OSKRBLJENOST Z Mg

V obroku za molznice v ožjem predporodnem obdobju naj bo vsaj 0,40% Mg v SS (Goff, 2004). Priporočena koncentracija Mg v krvnem serumu krav, ki bodo telile v naslednjih 24 do 48 urah je 0,8 do 1,3 mmol/L (Whitaker, 1997). Mulligan in sod. (2006) priporočajo merjenje serumskega Mg v zadnjih 7 dneh pred telitvijo.

DAJANJE VISOKIH ODMERKOV VITAMINA D

Dajanje visokih doz vitamina D poveča absorpcijo Ca v črevesu in resorpcijo iz kosti. Glej poglavje o vit. D na strani 75.

OMEJEVANJE KOLIČINE ZAUŽITEGA P

V obroku za presušene krave naj ne bo več kot 0,3% P v SS (Mulligan in sod., 2006). Presežek P v obroku povzroča zmanjšano aktivnost ledvičnega encima 25-hidroksivitamin D 1α-hidroksilaza, ki je odgovoren za nastanek 1,25-$(OH)_2D_3$. Krave pasme jersey, ki so dobivale presežek P pred telitvijo (>82 g P na dan), so bile bolj hipokalcemične od tistih, ki so dobivale le 10 g P (Kichura in sod., 1982).Tudi Jorgensen (1974) poroča, da so krave, ki so dobivale več kot 90 g P na dan, pogosteje obolele za obporodno parezo, kot tiste, ki so dobivale manjšo količino P. Celo manj kot 50 g na dan ni imelo negativnega učinka. Krave, ki pa so dobivale več kot 90 g P na dan, so imele povišano koncentracijo aP v krvni plazmi po porodu (Goff, 2000).

Razmerju Ca:P v zadnjem času ne pripisujejo večjega pomena, dokler je v razponu med 1:1 do 7:1. Večja odstopanja pa motijo metabolizem Ca (Goff, 200b).

OMEJEVANJE KOLIČINE ZAUŽITEGA K

K^+ je kation, ki ga govedo z obrokom največ dobi. Ko se absorbira v kri, vpliva nanjo tako, da jo alkalinizira. Visoka koncentracija K v obroku za visoko breje krave zato negativno vpliva na sposobnost živali, da ohranja normokalcemijo ob porodu (Goff, 2008).

Vse rastline potrebujejo za svojo rast K. Najmanj K vsebujejo termofilne trave, npr. koruza le 11 – 15 g K /kg SS, kar je najmanj med vsemi krmnimi travami. Nekatere trave, ki vsebujejo zelo malo K, so tudi izredno revne z beljakovinami in slabo prebavljive. Metuljnice in trave, ki uspevajo v hladnem delu leta, akumulirajo dosti več K, kot ga potrebujejo za rast, če je v zemlji dosti K. Na primer za optimalno rast lucerne je potrebna koncentracija K v rastlini 20 – 22 g/kg SS. Z omejevanjem gnojenja s K (predvsem gnojevka je izredno bogata s K in revna s Cl) se omeji tudi vsebnost K v rastlinah (Underwood in Suttle, 1999). Pri tem je pomembno omeniti, da mora biti rastlinska krma z nizko vsebnostjo K za krave palatabilna, ker v nasprotnem primeru to nima smisla.

Goff (2004) poroča, da je zelo težko obvladovati hipokalcemijo po telitvi, če je v obroku za krave molznice v predporodnem obdobju več kor 1,8% K v SS.

Po telitvi pa krave bolje prirejajo, če so na obroku, bogatem s K.

Nekatere rastline tudi zelo dobro akumulirajo Cl, ki pa deluje kot protiutež K. Zato je dodajanje klorida kot gnojila, ki znižuje kationsko anionsko razliko obroka, zelo zanimivo. V krmi se svetuje zaradi tega izmeriti K in Cl (Goff, 2006).

ZNIŽEVANJE KATIONSKO-ANIONSKE RAZLIKE V OBROKU (DCAD)

Krmljenje kislega obroka molznicam v ožjem predporodnem obdobju učinkovito znižuje incidenco obporodne hipokalcemične pareze. Na farmah je kisel obrok za molznice ob hkratni uravnoteženi količini hranilnih snovi v njem težko pripraviti. Pri pripravi takega obroka si pomagajo z dodajanjem anionskih soli ali kislin anionov, za katere je značilno, da vsebujejo več močnih anionov (Cl^- ali SO_4^{--}), kot kationov (predvsem Na^+ in K^+). S tem znižujejo DCAD v obroku in povzročajo kompenzatorno metabolično acidozo pri živalih, ki tak obrok uživajo (DeGaris in Lean, 2008). Ta praksa temelji na dejstvu, da razlika med absorbiranimi močnimi kationi in anioni iz obroka vpliva na kislinsko-bazno ravnotežje celotnega organizma, oziroma kakšen bo pH krvi. Osnova za to je, da se mora ob prebitku absorbiranih kationov iz krvi odstranjevati vodikovi kationi (H^+) za ohranjanje elektronevtralnosti, kar pa povzroči naraščanje pH vrednosti krvi oz. alkalizacijo. Ob prebitku anionov v obroku pa se mora količina H^+ tudi povečevati, kar zakisljuje organizem (Constable, 1999). Kisel obrok izboljša absorbcijo Ca in preko povzročitve metabolične acidoze tudi mobilizacijo Ca iz okostja.

Kostno tkivo predstavlja enega od glavnih pufrov za uravnavanje kislinsko baznega ravnotežja telesnih tekočin. Kadar se pH krvi zniža, to deluje na kostno tkivo tako, da sprošča katione (predvsem Ca) v kri in na ta način zvišuje pH. Prav s tem namenom se kravam v ožjem predporodnem obdobju dodaja anionske soli, ki znižujejo pH krvi. Ker so krave v tem obdobju največkrat v pozitivni bilanci Ca, se višek Ca izloča z urinom. V raziskavah so ugotovili, da se je količina izločenega Ca z urinom povzpela iz 0,1 g/dan na 4,3 g/dan pred telitvijo. Ko so krave doživele nastop hipokalcemije, se je izločanje Ca izrazito znižalo. Zgleda, da dodajanje anionskih soli pred telitvijo poleg boljšega odziva tkiv na PTH (ob nizkem pH imajo receptorji za PTH tako obliko, ki ima večjo afiniteto do PTH) povzroča tudi izrazitejše konstantno izplavljanje Ca iz okostja (4 do 5 g/dan), kljub normalni koncentraciji Ca v krvi. Po porodu, pa se lahko ta Ca porabi za potrebe laktacije (Goff, 2000).

Zelo dobro obliko preventive predstavlja krmljenje kislega obroka zadnje tri tedne pred telitvijo, v katerem je DCAD pod 0 mEq/kg SS (Horst in sod., 1994). Goff in Horst (1997) ter Mulligan in sod. (2006) priporočajo kot ciljno vrednost DACD celo -100 do -200 mEq/kg SS.

Teoretično DCAD izračunamo iz razlike med močnimi kationi (predvsem Na in K) in anioni (predvsem Cl in SO_4) v obroku:

DCAD (mEq/kg SS) = (mEq/kg SS Na^+ + mEq/kg SS K^+) – (mEq/kg SS Cl^- + 0,6 * mEq/kg SS S^{2-}).

Vsi omenjeni ioni se skoraj 100% resorbirajo iz obroka, zato ne potrebujejo nobenih koeficientov, razen SO_4^-, pri katerem nekateri uporabljao koeficient 0,6, ker ima le 60% sposobnosti Cl pri zakislevanju obroka (Oetzel in sod., 1991; Goff, 2004). Večina avtorjev tega koeficienta ne upošteva, ker menijo, da ne vpliva na končno verjetnost nastanka hipokalcemije ob predpostavki DCAD (Thilsing-Hansen in sod., 2003). Koeficienti, ki jih uporabljamo lahko za preračunavanje % določenega minerala v SS obroka v mEq/kg SS, so za Na 434,98; K 255,74; Cl 282,06 in S 623,75 (Oetzel, 1993).

Ugotovili so, da vsako zmanjšanje DCAD zaradi linearne odvisnosti zmanjša verjetnost hipokalcemične pareze (Lean in sod., 2006; DeGaris in Lean, 2008).

Čeprav na DCAD vplivajo tudi absorbirani Ca, Mg, P, mikroelementi, lahkohlapne maščobne kisline, amonijev ion ipd., je njihov vpliv majhen, zato ga večina ne upošteva (Goff, 2003; Oetzel, 2000). V obroku za visoko breje krave so omenjeni minerali praviloma v določeni znani količini, predvsem K in Cl pa se lahko prilagajata (Goff, 2006). Anionski obrok za visoko breje krave zadnje tri tedne pred telitvijo idealno vsebuje 1 do 1,2% Ca, 0,4% P, 0,4% Mg, 0,25% (za rast vampove mikroflore – nujen za sintezo nekaterih aminokislin) < S > 0,4% (v višji koncentraciji lahko povzroča nastajanje večje količine vodikovega sulfida v vampu, ki se z vdihavanjem ob ruktusu izredno dobro absorbira in povzroča toksičnosti), količino Na čim bliže potrebam, ki so 0,1%, in prav tako količino K, ki naj bo čim bliže 1% (Goff, 2003; NRC, 2001). Takemu obroku skušamo dodati Cl (idealen vir je komercialno pripravljena HCl, za ta namen) v količini, ki je za 0,5% (5 g Cl /kg SS) nižja od količine K v obroku. Na primer, če je v obroku 1,3% K, dodamo toliko Cl (v obliki anionskih soli), da dobimo 0,8% Cl. Zavedati se je potrebno, da veliko dodajanje anionskih soli (npr. nad 1,5% Cl v SS obroka) lahko močno zniža konzumacijo krme (Goff, 2008). Tako da se dodajanje anionskih soli odsvetuje v primeru, če je DCAD osnovnega obroka več kot +250 mEq/kg, ker bi bilo potrebno dodati preveč anionskih soli (Horst in sod., 1997). Tudi Goff (2004) poroča, da je zelo težko obvladovati hipokalcemijo, če obrok za visoko breje krave vsebuje več kot 1,8% K. Ugotovili so, da se pri zniževanju DCAD najbolje obnesejo Cl pripravki, ker so zelo učinkoviti in bolj palatabilni od ostalih anionskih soli in kislin močnih anionov z enakim

učinkom, npr. amonijev sulfat, kalcijev sulfat, kalcijev klorid, magnezijev klorid, magnezijev sulfat, žveplena kislina (Oetzel in sod., 1991; Goff, 2008).

Učinkovitost takega obroka lahko spremljamo z merjenjem pH urina, ki mora biti pri ČB kravah med 6,2 in 6,8 (Oetzel, 2000; Goff, 2003). pH urina, sredni curek, ki ne sme biti kontaminiran z iztrebki, lahko kontroliramo vsaj 48 ur po spremembi obroka. Idealno je, če se ga meri 6 do 9 ur po zaužitju obroka (to je izredno pomembno pri kravah, ki so krmljene le enkrat dnevno, za tiste, ki so dvakrat dnevno, to ni toliko pomembno). Zelo pomembno je, da se pH urina zadnji teden do telitve spremlja vsak dan (Goff, 2000). To je pomembno zato, ker je za nastanek kompenzirane metabolične acidoze potrebno le 4 do 5 dni takega režima. To bi načeloma zadostovalo ob predpostavki, da je datum poroda točno določen (Goff, 2006). Ponekod krmijo kisel obrok skozi celo presušitev, v tem primeru bo pH urina po 6 tednih normalno narasel za 0,5 stopnje pH zaradi uspešnega puferskega delovanja oksotja. Tudi ciljni pH se mora v tem primeru dvigniti za 0,5 (Goff, 2008).

DAJANJE PERORALNIH KALCIJEVIH PRIPRAVKOV V OŽJEM OBPORODNEM OBDOBJU

Ta način preventive lahko v neki meri smatramo že za kurativni ukrep. Gre za to, da je aktivni transport skozi enterocite nezadosten za ustrezno oskrbo živali in vzdrževanje normokalcemije. S p.o. dajanjem velikih doz zelo topnih Ca pripravkov povzročimo, da se Ca pasivno absorbira med enterociti zaradi velikega koncentracijskega gradienta. Najboljši rezultati so bili doseženi, če je bilo v eni dozi od 50 do 125 g Ca (Goff, 2006). Preventivno se lahko daje kravam po porodu peroralne preparate s Ca kompleksi z organskimi kislinami (npr. Ca propionat), ki niso kavstični, vendar pa tudi niso zelo učinkoviti viri Ca. Najučinkovitejši je Ca klorid, ki pa ima slabo lastnost, da je kavstičen, razen tega pa lahko pri večkratnem dajanju povzroči nekompenzirano metabolično acidozo (še posebej pri kravah, ki so bile na anionskem obroku) (Goff in Horst, 1993). Ca geli so v večini primerov sestavljeni tako, da ena doza vsebuje približno 50g Ca, kar omogoči resorpcijo približno 4 g Ca v kri, če je funkcija vampa ohranjena in je prisotna dobra pasaža (Goff in sod., 1996; Smith, 2002). Priporoča se dajanje prve doze takoj po porodu, druge pa približno 24 ur po porodu. Bolj pogosto dajanje je lahko toksično. Goff (2004) poroča, da lahko per oralna doza 250 g Ca v zelo topni obliki celo umori kravo.

2.6.8 OBVLADOVANJE OBPORODNE HIPOKALCEMIČNE PAREZE

Kljub številnim metodam preventive obporodne hipokalcemične ohromelosti, bolezni do danes še niso uspeli popolnoma preprečiti. V rejah molznic mora biti cilj, da za PH oboli pod 5% krav, ki so telile (Houe in sod., 2001).

2.6.9 RAZISKAVE OBPORODNE HIPOKALCEMIČNE PAREZE OPRAVLJENE NA KLINIKI ZA PREŽVEKOVALCE VETERINARSKE FAKULTETE UNIVERZE V LJUBLJANI

Primernost aplikacije visokega odmerka vitamina D_3 za preprečevanje nastanka PH so med prvimi v svetu potrdili prof. Gregorović s sodelavci že leta 1962 in nato še leta 1967 (Gregorović in Bekš, 1962; Gregorović in sod., 1967). Z raziskovanjem so nadaljevali tudi kasneje in leta 1970 in 1971 objavili izsledke raziskav (Jazbec in sod., 1970; Jazbec in sod., 1971). V raziskavah so ugotavljali vpliv dajanja visokih odmerkov vitamina D_3 na nihanje koncentracij Ca, aP, Mg in ALP pri kravah, ki so bile rizične za nastanek PH. Ugotovili so, da povišan odmerek vitamina D_3 zmanjšuje delež krav z obporodno hipokalcemijo in hipofosfatemijo ter skladno tudi incidenco PH. Kravam so dajali preparat Duphafral® D_3 – 1000, N.V. Philips Duphar, Holland, ki se še danes dobi na tržišču pod drugo blagovno znamko. V poskus je bilo zajetih 120 krav pasme jersey, starih med 4 in 8 let, ki so že vsaj enkrat zbolele za PH, v enakih prehranskih in drugih okoliščinah. Krave so razdelili v 3 skupine po 40 živali, in sicer:

1. skupina – krave, ki so jim aplicirali 5 M IE vitamina D_3, 2 do 8 dni AP (izjemoma 10 do 12 dni),
2. skupina - krave, ki so jim aplicirali 10 M IE vitamina D_3, 2 do 8 dni AP (izjemoma 10 do 12 dni),
3. skupina – kontrolne krave.

V drugem poskusu so opazovali rezultate dejanja visokega odmerka vitamina D_3 pri skupini 1200 krav molznic.

Rezultati raziskav so potrdili učinkovitost parenteralnega dajanja visokega odmerka vitamina D_3 na stabilizacijo koncentracije Ca in aP v krvnem serumu po telitvi. Pri tretiranih kravah so ugotovili tudi nižjo aktivnost ALP in nižjo serumsko koncentracijo Mg kot pri kontrolnih kravah. Potrjen je bil tudi progresiven delež zmanjšanja incidence PH s povečanjem odmerka

vitamina D_3. Vsi izsledki omenjenih raziskav potrjujejo, da je dajanje visokega odmerka vitamina D_3 2 do 8 dni AP učinkovit način preprečevanja PH.

Leta 1975 so Gregorović in sod. (1975) objavili izsledke študije na 852 kravah, različnih pasem, pri katerih so v 258 primerih imeli vsaj eno ali več ponovitev PH. V študiji so testirali tri metode zdravljenja PH:

1. z različnimi odmerki Ca-boroglukonata,
2. s Ca-boroglukonatom in insuflacijo vimena,
3. samo z insuflacijo vimena.

Ugotovili so, da je najuspešnejša metoda zdravljenja PH infuzija Ca-boroglukonata ob hkratni insuflaciji vimena. Opozarjajo, da naj bo parenteralni odmerek Ca čim nižji. Izsledki raziskave navajajo, da je po zdravljenju izključno s Ca-boroglukonatom prišlo do 30,3% deleža ponovitev PH, kar se ujema tudi z ugotovitvami drugih raziskovalcev. Z zmanjševanjem odmerka Ca na 200 do 500 mL 20% Ca-boroglukonata (3,6 - 9 g Ca) od največjega odmerka 800 - 1300 mL 20% Ca-boroglukonata (14,4 - 23,4 g Ca) se je zmanjšalo tudi število ponovitev PH pri kravah na 27,47% iz neverjetno visokih 75,36%. Pri kravah, ki so jim aplicirali nizko količino 20% Ca-boroglukonata (200 do 300 mL) in hkrati insuflirali vime, je bil odstotek ponovitev le 13,68.

Pri zdravljenju PH samo z insuflacijo vimena je bil delež ponovitev pri kravah 22,73%. Slaba stran slednje metode je, da se stanje huje prizadetim živalim počasi izboljšuje, kar narekuje stalno prisotnost veterinarja do stabilizacije živali. To je na terenu težko izvedljivo. Zaradi tega je bilo sklepno priporočilo raziskave zdravljenje z nizkim odmerkom Ca boroglukonata ob hkratni insuflaciji vimena, ki pa mora biti izvedeno strogo aseptično ter po potrebi podprto še z lokalno antibiotsko zaščito vimena.

Klinkon in sod. (1994) so v svoji raziskavi opravili metabolični profil (Ca, aP, Mg, AST, celotni bilirubin) pri 32 molznicah z znamenji PH. Krave so razdelili v dve skupini:

1. skupina – krave, ki so bile ob obisku pri zavesti, imele slab apetit in so neuspešno poskušale vstati (19 krav),
2. skupina – krave z bolj izraženo PH, ki niso poskušale vstati (13 krav).

V rezultatih raziskave ugotavljajo nižje vrednosti vseh treh mineralov in višje vrednosti AST in celotnega bilirubina pri kravah 2. skupine. Za terapijo krav so uporabili pripravek za i.v. aplikacijo, ki je poleg Ca vseboval še aP in Mg. Zdravljenje je bilo uspešno v 90,6%, v povprečju pa je bilo za popolno ozdravitev potrebnih 1,53 terapije.

Gašperlin in sod. (2002) so ugotavljali vpliv DCAD na koncentracijo serumskega Ca, aP in Mg pri 40 molznicah črno-bele pasme, ki so v preteklih laktacijah že imele PH in so bile izbrane iz treh farm, kjer so skupno redili 736 krav molznic. Po naključnem izboru so preiskovane krave razdelili v skupini:

1. skupina – anionska skupina (25 krav) je zadnjih 6 tednov pred telitvijo z zalivanjem dobivala 100 g amonijevega klorida in 100 g amonijevega slufata na dan; povprečni DCAD = -28 ± 132 mEq/kg SS ,
2. skupina – kontrolna skupina (kationska skupina) (15 krav); povprečni DCAD = 243 ± 132 mEq/kg SS.

Ugotovili so, da je bila koncentracija celokupnega Ca v krvi molznic anionske skupine v primerjavi s kontrolno skupino statistično značilno višja dva dni in en dan AP ter 2 dni PP, kar potrjuje pozitiven učinek anionske diete na homeostazo Ca. Na koncentracijo serumskega aP in Mg anionska dieta ni imela učinka. Kljub anionski dieti so v 1. skupini za PH zbolele 3 (12%), v kontrolni pa 2 (13,3%) kravi. Glede na analizo krme in visok delež krav, ki so obolele zaradi PH v anionski skupini, avtorji utemeljeno domnevajo, da je bil najpomembnejši vzrok za to premajhna količina Ca v obroku za krave v anionski skupini.

Zadnik in sod. (2008) so objavili ugotovitve raziskave na 30 molznicah črno-bele pasme, ki so imele v predhodnih laktacijah PH. Krave so naključno razdelili v 3 skupine po 10 živali:

1. skupina – krave so 1 teden pred telitvijo dobile 10 M IE vitamina D_3,
2. skupina – krave , ki so bile zadnja dva tedna zalivane s 300 g pripravka KatAn®,
3. skupina – kontrolna skupina krav brez terapije.

Najboljše rezultate je dosegla preventiva PH na osnovi vitamina D_3, kjer je za PH zbolela le 1 krava. V skupini, kjer so krave dobivale KatAn®, je 1 krava dobila PH in 1 zaostalo posteljico. V kontrolni skupini je 1 krava dobila PH, ena je imela zaostalo posteljico in ena je dobila levo dislokacijo siriščnika. Avtorji zaključujejo, da je na osnovi kliničnih in laboratorijskih izsledkov raziskave, najučinkovitejši in najenostavnejši način preprečevanja PH v malih in srednje velikih rejah krav molznic v Sloveniji dajanje visokega odmerka vitamina D_3.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 NAMEN RAZISKAVE

Namen doktorske naloge je preučevanje in merjenje specifičnih biokemijskih kazalcev kostnega metabolizma v obporodnem obdobju krav z namenom diagnosticiranja motenj metabolizma Ca in kostnega tkiva ter spremljanja učinkovitosti preventive hipokalcemije s parenteralnim dajanjem visokega odmerka vitamina D_3. Raziskava je potekala v poletnem in v zimskem času, kar je omogočilo ugotoviti vpliv letnega časa oz. paše na kazalce metabolizma kosti pri kravah molznicah. Metabolizem kostnega tkiva, posredno pa tudi metabolizem Ca, smo spremljali pri slovenskih črno-belih (ČB) kravah v intenzivni mlečni proizvodnji, na farmi. Krave smo razdelili v 4 skupine:

I. poletno skupino, kjer so se živali tudi pasle,
II. zimsko skupino, zimski pogoji reje, vhlevljene živali,
III. skupino krav, ki so obolele za obporodno hipokalcemično parezo, med pašno sezono ali v zimskem času vhlevitve,
IV. skupino, kjer so krave dobile visok odmerek vitamina D_3 pred telitvijo, kot preventivni ukrep pred nastankom obporodne hipokalcemične pareze.

Poseben poudarek študije je preučevanje metabolizma kostnega tkiva in Ca v času ožjega obporodnega obdobja t.i. tranzicije, ki zajema čas pozne presušitve, to je od 3 tednov pred telitvijo in začetka laktacije, do 3 tedne po telitvi. V tem obdobju so motnje metabolizma Ca in kostnega tkiva najpogostejše. Merila se je aktivnost kostno specifičnega encima *kostna alkalna fosfataza (bALP)* kot kazalca izgradnje kostnine in koncentracija razgradnega produkta kolagena I, *prečne povezave vezane C-terminalni telopeptidi (CTx)* kot kazalcev razgradnje kostnine. Hkrati smo merili tudi serumske koncentracije Ca, aP, Mg, aktivnost skupne ALP in koncentracijo estradiola, ki so tudi delno povezani z metabolizmom kostnega tkiva in Ca. Redno smo spremljali tudi splošno zdravstveno stanje živali in v primeru odstopanj nadaljevali z diagnostiko obolenja. Rezultati raziskave doprinašajo k razumevanju mehanizmov metabolizma Ca in zato k boljšemu obvladovanju motenj metabolizma Ca ter z njim povezane obporodne hipokalcemične pareze. Ugotoviti želimo tudi pomen meritev omenjenih kazalcev metabolizma kostnega tkiva pri verjetnosti, da bo žival zbolela za klinično zaznavno hipokalcemijo.

Hipoteze, ki jih želimo v raziskavi o dinamiki biokemijskih kazalcev metabolizma kosti krav molznic, tretiranih z visokim odmerkom vitamina D_3, kot preventiva obporodne hipokalcemije preveriti, so:

- biokemijski kazalci metabolizma kosti imajo po posameznih skupinah krav različne vrednosti,
- vrednosti biokemijskih kazalcev kosti se pri posameznih kravah spreminjajo glede na fiziološko obdobje,
- letni čas ima vpliv na biokemijske kazalce metabolizma kosti pri kravah z veliko prirejo mleka,
- parenteralno dajanje visokega odmerka vitamina D_3 pred porodom vpliva na nivo kazalcev kostnega metabolizma,
- z merjenjem biokemijskih kazalcev pred porodom lahko predvidimo verjetnost, ali bo krava v ožjem poporodnem obdobju imela hipokalcemično parezo ali ne,
- klimatski dejavniki (povprečna dnevna temperatura, najnižja dnevna temperatura, najvišja dnevna temperatura, sprememba T (razlika med najvišjo in najnižjo dnevno T), povprečna dnevna vlaga, povprečni dnevni zračni tlak in količina padavin) vplivajo na vrednosti biokemijskih parametrov, povezanih z metabolizmom kostnega tkiva.

3.2 DOVOLJENJE ZA RAZISKAVO

Protokol za raziskavo je odobrila Veterinarska uprava Republike Slovenije dne 21. 5. 2007, številka 34401-20/2007/3. Dovoljenje za uvoz in uporabo Duphafral® vit. D_3 10 mill. IE, 10 mL Fort Dodge veterinaria s.a., Španija je izdala Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke, dne 13. 8. 2007, številka 24-13/07. Temo in program doktorske naloge je avtor javno predstavil 10. 7. 2007 ter ponovno predstavil na 43. redni seji senata Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani, dne 28. 11. 2007, ki je temo in program tudi potrdil. Senat Univerze v Ljubljani je dal soglasje k temi doktorske disertacije na svoji 21. seji dne 12. 2. 2008. Na osnovi soglasja je dekan Veterinarske fakultete dne 29. 3. 2008 izdal odločbo o sprejemu teme doktorske disertacije, o določitvi mentorja in področja znanosti (veterinarska medicina).

3.3 ŽIVALI V POSKUSU

Raziskavo smo opravili v čredi slovenskih črno-belih (ČB) krav z intenzivno mlečno proizvodnjo na Farmi Grmače, Kmetijsko gozdarska zadruga Litija. Živali smo spremljali v času pašne sezone od 19. 4. 2007 do 11. 9. 2007 in v času njihove vhlevitve od 26. 10. 2007 do 4. 4. 2008. V raziskavo so bile vključene le klinično zdrave krave (n = 56).

V raziskavo smo vključili krave, ki so bile vsaj pred 4. telitvijo oziroma so že štirikrat ali večkrat telile, stare od 5 do 11 let.

Živali, vključene v raziskavo, smo razdelili v 4 skupine:

I. krave v poletnem načinu reje s pašo (n = 20),
II. krave v zimskem načinu reje (prosta reja z ležalnimi boksi) (n = 36),
III. od vseh 56 krav, ki so bile vključene v poskus, je med poskusom obolele za obporodno parezo 14 krav, ki smo jih obravnavali ločeno od zdravih (n = 14),
IV. od krav v zimskem načinu reje je bilo nadalje ločeno obravnavano še 13 naključno izbranih krav pred porodom, ki smo jih parenteralno tretirali z visokim odmerkom vitamina D_3 (n = 13).

Krave, vključene v raziskavo, smo spremljali od sredine presušitve do največ 20. dneva po telitvi. Kri za preiskave smo odvzeli v 4-ih fizioloških obdobjih (odvzemi):

1. približno 1 mesec do poroda ali sredi presušitve,
2. 1 do 10 dni pred porodom,
3. 12 do 48 ur po porodu (najbolj kritično obdobje za nastanek obporodne hipokalcemije),
4. 10 do 20 dni po porodu (neposreden vpliv telitve na metabolizem kosti je v tem obdobju že majhen).

V skupini krav, ki so obolele za obporodno hipokalcemično parezo, smo vzorce krvi vzeli pred terapijo s Ca pripravki. V raziskavo so bile vključene le tiste živali, ki so se ugodno odzvale na standardno terapijo hipokalcemične pareze, to je 2 g čistega Ca / 100 kg t.t. i.v. v obliki Ca boroglukonata (23 ali 40%).

Tabela 3: Število odvzemov vzorcev krvi po posameznih skupinah glede na fiziološka obdobja preiskovanih krav

	FIZIOLOŠKO OBDOBJE				**Skupaj vzorcev krvi**
SKUPINA KRAV	1.	2.	3.	4.	
Paša - poletje (n = 15)	15	15	15	15	60
Vhlevljene - zima (n = 14)	14	14	14	14	56
Krave z obporodno parezo (n = 14)	14	14	14	14	56
Preventiva vit. D_3 (n = 13)	13	13	13	13	52
skupaj	56	56	56	56	224

3.4 REJA ŽIVALI

V času poskusa so na farmi redili v povprečju 205 krav molznic in mlado živino (n = 175), tako da je bilo v povprečju na farmi okoli 380 glav goveda. Živali na farmi so nastanjene v dveh objektih in sicer v proizvodnem hlevu in porodnišnici. Proizvodni hlev je bil zgrajen leta 1984. Način reje v njem je prosta reja na betonskih rešetkah z ležalnimi boksi v dveh vrstah na vsaki strani in kapaciteto gnojnične jame 300 m^3. Krmilna miza je speljana vzdolžno po sredini hleva, kar omogoča dovoz krme z mešalno krmilno prikolico neposredno na krmilno mizo. Živali so v hlevu razdeljene na štiri skupine glede na mlečnost. Porodnišnica je bila zgrajena leta 1976. Sistem reje v porodnišnici je vezana reja, na Grabnerjevih navezah na dolgih betonskih stojiščih, pokritih z gumo in nastlanih z žagovino v dveh vrstah, med katerima je čistilni in servisni hodnik. Za stojišči in proti hodniku je kanal, iz katerega s pomočjo pehal odstranjujejo gnoj. Krmilna miza je med steno in stojišči, ob njej pa je ožji hodnik za dovoz krme s pomočjo vozička. Individualni boksi za novorojena teleta so tudi v porodnišnici in prav tako skupinski boksi, kjer so teleta do starosti okoli enega meseca. Mlado živino vzrejajo v ločenem hlevu, v boksih z drsečim gnojem do starosti pol leta. Od tu jih preselijo v drug hlev z globokim nastiljem in izpustom do premika v hlev za presušene krave, ki je del porodnišnice in ima ležalne bokse na prostem. Porodnišnico čistijo in nastiljajo 2 krat dnevno. Ležalne bokse čistijo 3 krat tedensko oz. po potrebi tudi večkrat. Krave molzejo strojno na molzišču v obliki ribje kosti 2 x 10 molznih enot (Alfa Laval), dvakrat na dan (ob 5. uri in ob 17. uri). Za potrebe farme obdelujejo 160 ha kmetijskih površin, od katerih je 50

ha za pridelavo koruze, ostale površine pa so pašniki in travniki. Za skladiščenje silaže imajo koritaste silose. Seno dosušujejo na sušilni napravi kapacitete 120 ton. Od konca septembra pa do 15. aprila so krave vhlevljene (razen, če vremenske razmere narekujejo drugače), preostali čas pa so na paši. Za reprodukcijo in zdravje krav na farmi skrbi po pogodbi veterinar. Na farmi vodijo ambulantni dnevnik, v katerega zapisujejo vsa obolenja, posege in terapije. Čreda je vključena v A mlečno kontrolo.

Tabela 4: Skupna in povprečna prireja mleka ter povprečna vsebnost maščobe in beljakovin na farmi Grmače v letu 2007 in 2008

	Skupna prireja v obdobju			Standardna laktacija			Cela laktacija		
Leto	Mleko (kg)	Maščobe %	Beljakovine %	Mleko (kg)	Maščoba %	Beljakovine %	Mleko (kg)	Maščobe %	Beljakovine %
2007	1.666.648	3,93	3,26	8.423	3,9	3,22	9.165	3,96	3,28
2008	1.692.418	3,96	3,28	8.413	3,92	3,23	9.187	3,96	3,27

Povprečna prireja mleka na kravo na molzni dan (po mlečnih kontrolah) je v času pašne sezone 2007 znašala v mesecu aprilu 26,23 kg (predvideno letno na kravo: 8.548 kg), maju 24,74 kg (predvideno letno na kravo: 7.595 kg), juniju 24,90 kg (predvideno letno na kravo: 7.421 kg). juliju 26,83 kg (predvideno letno na kravo: 8.201 kg), avgust 26,56 kg (predvideno letno na kravo: 8.193 kg in septembru 26,44 kg (predvideno letno na kravo: 8.183 kg). V zimskem času 2007/2008 je bila povprečna prireja mleka na molzni dan v mesecu novembru 25,85 kg (predvideno letno na kravo: 8.242 kg), decembru 25,70 kg (predvideno letno na kravo: 8.468 kg), januarju 25,67 kg (predvideno letno na kravo: 8.181 kg), februarju 26,40 kg (predvideno letno na kravo: 8.356 kg) in v marcu 26,53 kg (predvideno letno na kravo: 8.551 kg).

Povprečna dolžina brejosti krav na farmi je v letu 2007 znašala 282 dni, povprečna doba med telitvama pa 419 dni, v letu 2008 je bila povprečna dolžina brejost 280 dni in doba med telitvama 406 dni. V letu 2007 so v povprečju rabili do 1. osemenitve 97 dni, v letu 2008 pa 91 dni.

Starostni sestav proizvodne črede v letu 2007 je bil naslednji: 37,2% molznic je bilo v četrti ali višji laktaciji, 23,8% je bilo prvesnic, ostalo so bile krave v 2. ali 3. laktaciji; v letu 2008

pa je bilo v četrti ali višji laktaciji 30% molznic, prvesnic je bilo 30,5% ostalo pa so bile krave v 2. in 3. laktaciji.

Enainpetdeset (20,9%) krav so v letu 2007 vključili v čredo, izločili pa 42 (17,2%) krav, v letu 2008 pa so v čredo vključili 74 krav (26,8%), izločili pa 72 krav (26,1%), Vzrok zakola, izločitve ali pogina so bile v letu 2007 v 42,9% (18 krav) plodnostne motnje, v 19,1% (8 krav) mastitis, v 7,1% (3 krave) bolezni parkljev in nog, v 4,8% (2 kravi) pogin iz neznanega vzroka, v 4,8% (2 krave) zastrupitev, 2 krave (4,8%) so bile izločene zaradi poškodb nog in parkljev, 2 kravi (4,8%) pa zaradi pljučnice. V letu 2008 so bili vzroki pogina ali izločitve v 41,7% (30 krav) plodnostne motnje, v 13,9% (10 krav) mastitis, v 12,5% (9 krav) bolezni parkljev in nog, v 6,9% (5 krav) nenadna smrt, v 4,2% (3 krave) presnovne in prebavne motnje. Tri krave (4,2%) so bile izločene zaradi poškodb nog in parkljev, po 2 kravi (2,8%) pa zaradi nizke produkcije in iz neznanih razlogov.

Velika večina telitev (čez 95%) je bila v letu 2007 in 2008 lahkih ali brez posebnosti. Abortusov v letu 2007 in 2008 ni bilo. Na farmi stremijo za tem, da so krave presušene okoli 60 dni. Krave ovimljajo 15 dni pred telitvijo.

3.5 KRMA

V času raziskave so bile živali v poskusu na svojem običajnem in načrtovanem obroku, ki se skozi raziskavo ni spreminjal (tabela 5).

Tabela 5: Sestava miks obroka za krave v poskusu

Sestavine krmnega obroka	**Presušene krave**	**Visoko breje krave (close up)**	**Krave od telitve do 25 dni v laktaciji**
Slama (kg)	3	0,2	0,2
Travna silaža (kg)	12	7	8
Koruzna silaža (kg)	7	14	16
Soja (kg)	/	0,3	0,4
Protiketozno krmilo (Emona, Slovenija) (kg)	/	0,5	1
K Mix (Emona, Slovenija) (kg)	/	1,5	2
Vitamini (Emona, Slovenija) (kg)	0,1 (Rumisal za presušene: 3% Ca, 8% P, 7% Mg, 125.000 IE/kg Vit.D_3)	0,1	0,15

Presušene krave v zimskem času so dobile miks obrok za presušene krave do sitega, približno 12 kg SS. V poletnem času so presušene krave bile ves dan na paši.

Miks obrok za visoko breje krave (close up) je bil omejen na 10 do 12 kg SS / kravo / dan. Dodatno so imele krave na razpolago še seno do sitega. V poletnem času so imele krave še stalen dostop na pašnik.

Miks obrok za visoko breje krave (close up skupino) (zadnjih 15 dni do poroda) je bil omejen na do 15 kg SS na kravo / dan. Kemijska sestava miks obroka za posamezne kategorije krav je prikazana v tabeli 6. Krave so imele na razpolago še seno do sitega (približno 2 kg so ga še zaužile). V poletnem času so bile krave še vsako jutro za 2 do 3 ure na pašniku.

Tabela 6: Kemijska sestava mix obroka za posamezne kategorije krav, preračunana na SS obroka

	Presušene krave	**Visoko breje krave (close up)**	**Krave od telitve do 25 dne v laktaciji**
NEL (MJ/kg SS)	4,53	6,40	7,00
SV (% SS)	28,00	17,30	17,20
SB (% SS)	8,54	13,00	16,20
Ca (% SS)	0,49	0,70	0,81
P (% SS)	0,30	0,37	0,42
Mg (% SS)	0,27	0,37	0,41
Na (% SS)	0,11	0,20	0,22
K (% SS)	1,52	1,60	1,50
Cl (% SS)	0,18	0,21	0,23
S (% SS)	0,19	0,20	0,24

Tabela 7: Kemijska analiza koruzne silaže letnik 2006 in 2007

	2006	**2007**
suha snov (g/kg)	408,25	399,36
surovi pepel (g/kg SS)	31,11	34,01
surove beljakovine (g/kg SS)	66,42	69,11
surove vlaknine (g/kg SS)	190,92	187,12
PB (g/kg SS)	29,56	28,31
ŠE (ŠE/kg SS)	687,00	675,00
NEL (MJ/kg SS)	6,75	6,36
fosfor (g/kg SS)	1,96	1,69
kalcij (g/kg SS)	1,83	1,73
magnezij (g/kg SS)	0,96	0,99
kalij (g/kg SS)	7,73	7,64
natrij (g/kg SS)	0,03	0,04

Tabela 8: Kemijska analiza travne silaže letnik 2006 in 2007 (% v SS, razen suha snov in vlaga)

	2006	**2007**
suha snov (%)	35,8	30,4
vlaga (%)	64,2	69,6
surovi pepel (%)	15,70	13,13
surove beljakovine (%)	17,7	13,6
surove maščobe (%)	3,2	3,0
surove vlaknine (%)	25,1	24,1
PB (g/kg)	116	96
ŠE (ŠE/kg SS)	582,00	508,00
fosfor (%)	0,39	0,29
kalcij (%)	1,38	1,28
magnezij (%)	0,46	0,44
kalij (%)	2,19	2,10
natrij (%)	0,06	0,10
kloridi (g/100 g SS)	0,68	0,62
žveplo (g/kg SS)	2,12	2,07

Tabela 9: Kemijska analiza sena pridelanega leta 2007 (% v SS, razen suha snov in vlaga)

suha snov (g/kg)	893,14
surovi pepel (g/kg SS)	62,21
fosfor (%)	2,80
kalcij (%)	5,97
magnezij (%)	2,34
kalij (%)	14,85
natrij (%)	0,49

Tabela 10: Kemijska analiza paše, junij 2007 (% v SS, razen suha snov in vlaga)

suha snov (%)	19,8
vlaga (%)	80,2
surovi pepel (%)	9,56
surove beljakovine (%)	20,0
surove maščobe (%)	2,9
surove vlaknine (%)	23,1
PB (g/kg)	154
ŠE (ŠE/kg SS)	593,3
fosfor (%)	4,00
kalcij (%)	6,10
magnezij (%)	2,94
kalij (%)	19,95
natrij (%)	1,69

Obrok so krave dobivale v obliki popolne krmne mešanice (miks obrok). Krave so krmili dvakrat na dan s pomočjo krmilnega voza, v katerem se obrok zmeša v popolno krmno mešanico. Aktualen obrok na farmi je bil izračunan glede na rezultate analiz krme (tabele 7, 8, 9, 10) in je v skladu z normativi National research council (2001) za posamezne kategorije molznic holjštajn fizijske pasme.

Na osnovi sestave obroka ocenjujemo, da je bila vrednost DCAD (računana po metodologiji DCAD = [(Na + K) – (Cl + S)], ki najbolje napoveduje povečano verjetnost za nastop hipokalcemične poporodne pareze (Lean in sod., 2006)) v obroku za presušene krave v zimskem času +250 mEq/kg SS, poleti, ko so bile na paši, pa ga ocenjujemo na čez +300 mEq/kg SS, za krave 15 ali manj dni pred telitvijo +280 mEq/kg SS in na začetku laktacije (prvih 25 dni laktacije) okoli +200 mEq/kg SS.

Tabela 11: Faktorji za preračunavanje % v SS v mEq/kg v SS za izračun DCAD (Husband, 2005)

Element	Faktor za preračunavanje
Natrij	435,0
Kalij	255,7
Klor	-282,1
Žveplo	-623,8

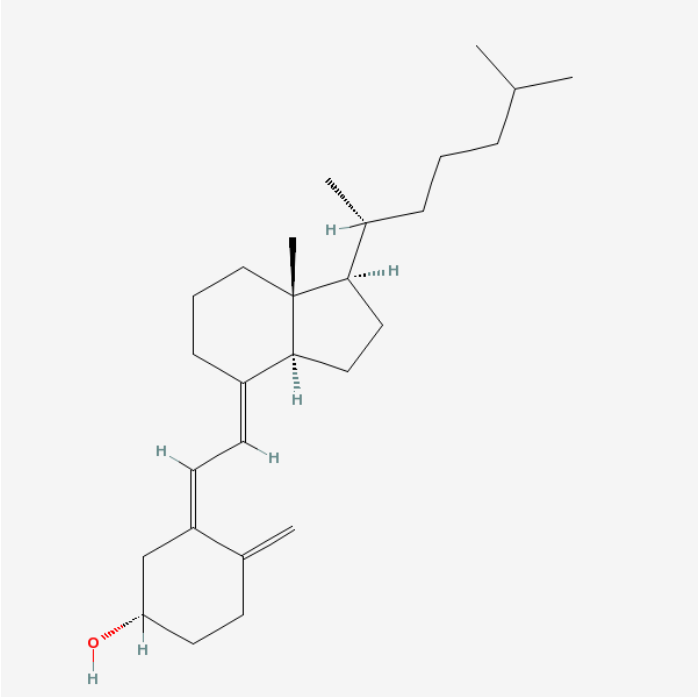
3.6 DAJANJE VITAMINA D_3 IN UPORABLJENI PREPARAT

V skupini krav, ki so pred porodom dobile visok odmerek vitamina D_3 (holekalciferola), sem tega po navodilu proizvajalca apliciral sam »lege artis« i.m. v *m. semimembranosus*, v dozi 10 milijonov I.E. (10 mL) na kravo v času 2 do 8 dni pred predvideno telitvijo. Pred aplikacijo vitamina sem kravam vzel vzorce krvi.

Podatki o preparatu: DUPHAFRAL® D_3 1000, stekleničke po 10 mL,

- preparat je bistra, brezbarvna do bledo rumena in rahlo viskozna injekcijska tekočina,
- proizvajalec: Fort Dodge Veterinaria, S.A., Vall de Bianya, Španija,
- Batch No.: E11229,
- proizveden maja 2007,
- uporaben do maja 2010,
- aktivna substanca: Vitamin D_3 (holekalciferol oz. kalciol) 1.100.000 IU/mL,
- pomožni substanci benzyl alkohol 9,0 mg/mL in propilen glikol 100 mg/mL,
- pH 7,1,
- temperatura pri kateri se substanca odloči: ≥60° C
- gostota 1,03 g/mL,
- prostornina vsebine vsaj 10 mL.

Kontraindikacije za uporabo preparata niso znane, razen če je prisotna znana preobčutljivost na preparat. Preparat nima karence. Hranimo ga v temnem prostoru na temperaturi do +20° C.



Shema 8: Holekalciferol – struktura; molska masa je 384,63766 [g/mol], molekulska formula C_{27} H_{44} O (vir: http://en.wikipedia.org/wiki/Cholecalciferol)

3.7 METEOROLOŠKI PODATKI

Meteorološki podatki so bili merjeni na meteorološki postaji v Šmartnem pri Litiji. V raziskavi smo uporabili naslednje podatke: povprečna dnevna temperatura (T povp.), najnižja dnevna temperatura (T min.), najvišja dnevna temperatura (T max), sprememba T (razlika med najvišjo in najnižjo dnevno T), povprečna dnevna vlaga, povprečni dnevni zračni tlak in količina padavin.

3.8 JEMANJE VZORCEV KRVI

Vzorce venske krvi smo jemali v epruvete brez dodanega antikoagulanta (Venoject, plain silicone coated, Terumo Europe N.V., Belgija) s pomočjo vakuumskega odvzema iz *v. caudalis medianae*, po protokolu v točki 3.2, vedno v dopoldanskem času med 9. in 12. uro. Kri smo pustili spontano koagulirati na sobni temperaturi, nato smo krvni serum odlili in ga še 2x centrifugirali na 3000 obratih na minuto po 10 minut. Tako pripravljen krvni serum smo razdelili v štiri epruvete in ga do preiskave zamrznili na – 20 ° C.

3.9 OPRAVLJENE PREISKAVE

Biokemijske preiskave krvnih serumov smo opravili v laboratoriju za klinično biokemijo Klinike za prežvekovalce Veterinarske fakultete v Ljubljani, kjer smo merili koncentracijo Ca, aP, Mg in aktivnost skupne serumske ALP. V laboratoriju Splošne bolnišnice Jesenice, smo merili aktivnost bALP in koncentracijo CTx. Estradiol smo merili v laboratoriju oddelka za Nuklearno medicino Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani. Vse preiskave so bile opravljene avtomatizirano. Vsi trije laboratoriji izvajajo intra in interlaboratorijsko kontrolo kakovosti dela.

Vrednosti pH urina smo merili na samem mestu, takoj po odvzemu s pomočjo pH testnih lističev (glej poglavje o merjenju pH urina na strani 120).

3.9.1 MERJENJE KONCENTRACIJE CELOKUPNEGA SERUMSKEGA KALCIJA

Princip metode

Koncentracijo celokupnega serumskega Ca smo izmerili s kolorimetrično metodo. Ca ioni (prosti in tisti, ki so bili vezani na albumine) tvorijo z reagentom O-krezolftaleinom v alkalnem mediju kompleks vijolične barve. Absorbanca, ki jo izmerimo zaradi prisotnosti kompleksa, je sorazmerna koncentraciji Ca v vzorcu seruma.

Uporabljeni reagenti in analizni postopek

Uporabili smo reagenčni komplet Calcium Colorimetric Method, RX Daytona, Randox, Irska. Analizni postopek smo izvedli po navodilih proizvajalca na avtomatiziranem biokemijskem analizatorju RX Daytona, Randox, Irska.

3.9.2 MERJENJE KONCENTRACIJE SERUMSKEGA ANORGANSKEGA FOSFATA

Princip metode

Koncentracijo serumskega aP smo izmerili s kolorimetrično metodo, kjer aP reagira z amonijevim molibdatom ob prisotnosti žveplove kisline, pri čemer nastaja fosfomolibdatni

kompleks, katerega absorbanca se meri pri 340 nm. Absorbanca je sorazmerna koncentraciji aP v vzorčnem serumu.

Uporabljeni reagenti in analizni postopek

Uporabili smo reagenčni komplet Inorganic Phosphorus UV Method, RX Daytona, Randox, Irska. Analizni postopek smo izvedli po navodilih proizvajalca na avtomatiziranem biokemijskem analizatorju RX Daytona, Randox, Irska.

3.9.3 MERJENJE KONCENTRACIJE SERUMSKEGA MAGNEZIJA

Princip metode

Koncentracijo serumskega Mg smo izmerili s kolorimetrično metodo. Mg ioni reagirajo s ksilidil modrim v alkalnem mediju, pri čemer nastaja vodotopni škrlatnordeč kelat. Povečanje absorbance ksilidil modrega je pri valovni dolžini 510 nm proporcionalna koncentraciji Mg ionov v vzorcu. Ca se odstrani iz reakcije z vezavo na EDTA.

Uporabljeni reagenti in analizni postopek

Uporabili smo reagenčni komplet Magnesium (Xylidil Blue) Colorimetric Method, RX Daytona, Randox, Irska. Analizni postopek smo izvedli po navodilih proizvajalca na avtomatiziranem biokemijskem analizatorju RX Daytona, Randox, Irska.

3.9.4 MERJENJE AKTIVNOSTI CELOKUPNE SERUMSKE ALKALNE FOSFATAZE (ALP)

Princip metode

Katalitično koncentracijo celokupne serumske ALP smo zmerili s kolorimetrično metodo. ALP iz vzorca ob prisotnosti Mg ionov povzroča hidrolizo p-nitrofenilfosfata, pri čemer nastaja p-nitrofenol, ki je rumene barve. Merili smo absorbanco p-nitrofenola pri valovni dolžini 405 nm. Absorbanca je sorazmerna aktivnosti ALP v vzorcu.

Uporabljeni reagenti in analizni postopek

Uporabili smo reagenčni komplet ALP opt. Liquid Alkaline Phosphatase, RX Daytona, Randox, Irska. Analizni postopek smo izvedli po navodilih proizvajalca na avtomatiziranem biokemijskem analizatorju RX Daytona, Randox, Irska.

3.9.5 MERJENJE AKTIVNOSTI SERUMSKE KOSTNO SPECIFIČNE ALKALNE FOSFATAZE (bALP)

Princip metode

Katalitično koncentracijo bALP smo izmerili z encimsko imunoanalizo. Uporabili smo anti b ALP specifična protitelesa, ki so adsorbirana na notranjo steno mikrotiterske plošče. Anti bALP Ab tvorijo kompleks z bALP iz vzorca. Po dodatku substrata (p–nitrofenilfosfat) nastane obarvana spojina, katere absorbanco smo merili pri valovni dolžini 405 nm. Absorbanca je sorazmerna aktivnosti bALP v vzorcu.

Uporabljeni reagenti in analizni postopek

Uporabili smo reagenčni komplet Alkphase–B, Metra, Biosystems, Kalifornija, USA. Analizni postopek smo izvedli po navodilih proizvajalca. Absorbanco obarvane spojine po končani reakciji smo izmerili na optičnem čitalcu Humareader, Human pri valovni dolžini 405 nm ob uporabi standardne krivulje za bALP. Standarno krivuljo smo dobili po analizi 6 standardov, katerih koncentracije bALP so bile: 0,0; 2,0; 20,0; 40,0; 80,0; 140,0 U/L.

3.9.6 MERJENJE KONCENTRACIJE SERUMSKIH CTx

Princip metode

Koncentracijo CTx v serumu smo določali z elektrokemiluminiscentno imunoanalizo (ECLIA). Prisotni CTx v vzorcu reagirajo z monoklonalnimi anti β - CTx Ab. Tvorbo dvojnega kompleksa omogoča dodatek mo β - CTx Ab označenih z rutenijem. Sproščeni kemiluminiscentni signal je sorazmeren koncentaciji β - CTx v vzorcu.

Uporabljeni reagenti in analizni postopek

Uporabili smo ELECYSIS 3 – CrossLaps (Roche Diagnostics, Basel, Švica) reagenčni komplet. Koncentracijo CTx smo izmerili na ELECYS analizatorju 1010 po navodilih proizvajalca.

3.9.7 MERJENJE KONCENTRACIJE 17β-ESTRADIOLA

Princip metode

Metodo uvrščamo med kompetitivne imunokemične, kjer estradiol (katerega koncentracijo določamo) ter estradiol vezan na alkalno fosfatazo tekmujeta za vezavo na omejeno količino za estradiol specifičnih zajčjih protiteles, vezanih na trdno podlago. Ob dodatku kemiluminiscentnega substrata se z alkalno fosfatazo ustvari signal. Količina nastalega signala je obratno-sorazmerna količini estradiola v vzorcu.

Uporabljeni reagenti in analizni postopek

Za analizo smo uporabili analizator "Immulite 2000" proizvajalca Siemens (Siemens Medical Solutions Diagnostics; Los Angeles, ZDA) ter analizni komplet "Immulite 2000 - Estradiol" proizvajalca Siemens (Siemens Medical Solutions Diagnostics; Los Angeles, ZDA).

3.9.8 JEMANJE VZORCEV URINA

Urin smo jemali po spontanem uriniranju oz. po nadraženju krav k uriniranju z gladenjem kože pod vulvo v čiste plastične posode.

3.9.8.1 MERJENJE pH VREDNOSTI URINA

Princip metode

Merjenje pH s pomočjo indikatorskih lističev deluje po istem principu reakcije kot titracijske metode indikacije. pH listič je absortivni celulozni papir, nasičen z mešanico indikatorjev, ki omogočajo razlikovanje med različnimi pH vrednostmi raztopin. Indikatorji so organske sestavine, ki spremenijo barvo v sorazmerju s koncentracijo vodikovih ionov v raztopini. Glede na specifično območje pH vrednosti se barva postopoma spreminja. Z lističi lahko

merimo pH v območju od 0 do 14 in sicer od 0 do 9 na 0,5 pH enote natančno, od 9 do 14 pa na 1 pH enoto natančno.

Uporabljeni reagenti in analizni postopek

Za merjenje pH smo uporabili pH lističe PANPEHA® pH 0 – 14, proizvajalca Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Nemčija za Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, ZDA. Indikatorski listič pomočimo v raztopino, ki ji želimo izmeriti pH, spremembo barve lističa primerjamo z barvo na barvni skali. Vrednost pH odčitamo z barvne skale pri barvi, ki se ujema z barvo lističa, s katerim smo merili.

3.10 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Podatke in rezultate meritev smo obdelali s statističnim programom SPSS, verzija 15.0 (SPSS Inc., Chicago, ZDA). Meja statistične pomembnosti je bila pri $p<0.05$.

Deskriptivna statistika

Številske spremenljivke (biokemijski parametri: Ca, aP, Mg, ALP, bALP, CTx in estradiol) smo predstavili z aritmetično sredino in standardno deviacijo oz. z mediano in interkvartilnim razmikom v primeru asimetrične porazdelitve podatkov. Za vsako spremenljivko sta podani njena najnižja in najvišja vrednost. Trend naraščanja in upadanja povprečnih vrednosti biokemičnih dejavnikov je glede na odvzem prikazan grafično.

Ugotavljanje vpliva skupine in odvzema na merjene parametre

Z dvosmerno analizo variance (ANOVA) s ponavljanjem (mešani model ANOVA) smo ugotavljali razlike v povprečni vrednosti biokemičnih parametrov med poletno skupino, zimsko skupino in skupino krav s PH ter med odvzemi. Pri mešanem modelu ANOVA v splošnem ugotavljamo razlike med dvema ali več neodvisnimi skupinami, pri čemer na vsaki poskusni enoti izvajamo ponovljene meritve. Tako je pri mešanem modelu ANOVA en dejavnik, t.i. spremenljivka 'med enotami' (between-subject variable), drug dejavnik pa t.i. spremenljivka 'znotraj enot' (within-subject variable). V našem primeru predstavlja spremenljivko 'med enotami' skupina krav, spremenljivko 'znotraj enot' pa odvzemi.

V primeru nenormalne porazdelitve vrednosti dejavnika smo uporabili Friedmanov preizkus, ki je neparametrična alternativa preizkusu ANOVA s ponavljanjem. Mnogotere primerjave kot 'post hoc' analizo smo izvedli z Bonferronijevo korekcijo p vrednosti oz. v primeru nenormalne porazdelitve podatkov z mnogoterimi Wilcoxonovimi preizkusi predznačenih rangov z Bonferronijevo korekcijo napake prve vrste (α).

Ugotavljanje vpliva dajanja visokega odmerka vitamina D_3 na Ca, aP, bALP in CTx ob tretjem in četrtem odvzemu

Za primerjavo povprečne vrednosti Ca, aP, bALP in CTx med kravami, ki so dobile vitamin D, in kravami, ki vitamina D niso dobile, smo uporabili parametrični t test oz. Mann-Whitney U test kot neparametrično alternativo za nenormalno porazdeljene podatke.

Ugotavljanje povezanosti biokemičnih parametrov z vrednostjo estradiola in s klimatskimi dejavniki

Povezanost biokemičnih parametrov s klimatskimi dejavniki ter povezanost biokemičnih parametrov med seboj smo ugotavljali s korelacijo. Če so bile teoretične predpostavke za parametričen test izpolnjene, smo interpretirali Pearsonov korelacijski koeficient, sicer smo osnovne podatke logistično transformirali ali pa uporabili neparametrično analizo z določanjem Kendallovega koeficienta korelacije rangov.

Ugotavljanje vpliva bALP in CTx ter ostalih biokemijskih parametrov v ožjem predporodnem obdobju na vrednosti Ca po telitvi (3. odvzem)

Vpliv biokemičnih kazalcev kostnega metabolizma (bALP, CTx) na vrednosti Ca v poporodnem obdobju smo analizirali z linearno regresijo. Specifičnost in senzitivnost izmerjenih vrednosti dejavnika bALP in CTx pri diagnosticiranju hipokalcemije (obporodne pareze) smo določili z izračunom ROC (receiver operating characteristic) krivulje. Z deležem površine pod ROC krivuljo (AUC, area under a ROC curve) in pripadajočim 95% intervalom zaupanja (IZ) smo določili diagnostično natančnost vrednosti parametra bALP in CTx. Na osnovi najugodnejše kombinacije specifičnosti in senzitivnosti smo določili razmejitveno točko (cut-off point) za oba omenjena parametra.

Povezanost dejavnika CTx s pojavljanjem obporodne hipokalcemije smo analizirali z enostavno logistično regresijo. Vrednosti dejavnika CTx smo dihotomizirali na osnovi

mediane kot mejne vrednosti: ≥0,121 ng/L in <0,121 ng/L. Regresijski koeficient smo izrazili kot razmerje obetov, s pripadajočim 95% intervalom zaupanja.

Ker so ostali dejavniki okolja v enaki meri vplivali na vse živali, smo jih v našem eksperimentalnem načrtu opredelili za slučajne ter jih zato kratko malo nismo testirali. Prav tako smo predpostavljali, da so napake merjenja slučajno normalno porazdeljene, saj smo vse vzorce analizirali v istem laboratoriju, z isto metodo ter preverjeno kvaliteto dela.

4 REZULTATI

4.1 OPISNA STATISTIKA REZULTATOV IZMERJENIH BIOKEMIJSKIH PARAMETROV IN REZULTATI SEMIKVANTITATIVNE OCENE pH VREDNOSTI URINA

Krave, vključene v raziskavo, so v povprečju telile 5,4 krat, oziroma vsaj 4 krat in največ 9 krat. Opisna statistika rezultatov biokemijskih preiskav krvi, preiskovanih krav glede na letni čas, PH in dajanje visokega odmerka vit. D_3 po posameznih odvzemih, je prikazana v tabelah 12 in 13.

Pri vseh karavah smo s testnimi lističi za ugotavljanje pH izmerili pH urina med 8 in 9. Krave v ožjem obporodnem obdobju so imele pH 8 ali 8,5 (natančnost testnih lističev je bila 0,5 enote).

Tabela 12: Opisna statistika biokemijskih parametrov po odvzemih (fizioloških obdobjih) pri skupini 15 krav v poletnem obdobju (skupina I), 14 krav v zimskem obdobju (skupina II) in 14 krav s hipokalcemično poporodno parezo (skupina III)

Parameter	Skupina	I (n = 15)				II (n = 14)				III (n = 14)			
	Odvzem	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Ca	$\bar{X}$	2,48	2,35	1,94	2,34	2,33	2,22	2,04	2,28	2,38	2,25	1,16	2,20
	SD	0,12	0,10	0,28	0,11	0,11	0,21	0,18	0,11	0,13	0,15	0,32	0,18
	Min.	2,27	2,14	1,25	2,17	2,04	1,85	1,73	2,12	2,18	1,91	0,57	1,74
	Max.	2,71	2,49	2,35	2,52	2,47	2,43	2,38	2,55	2,56	2,51	1,68	2,44
	mediana	2,47	2,35	1,94	2,34	2,35	2,29	2,04	2,28	2,40	2,25	1,16	2,25
aP	$\bar{X}$	1,98	2,02	1,77	1,91	2,13	1,90	1,71	2,10	2,09	1,99	0,93	1,86
	SD	0,36	0,34	0,49	0,27	0,27	0,35	0,53	0,35	0,30	0,24	0,43	0,33
	Min.	1,33	1,19	1,04	1,54	1,86	0,90	0,72	1,61	1,66	1,39	0,36	1,29
	Max.	2,96	2,69	2,59	2,62	2,58	2,49	2,47	3,00	2,67	2,39	1,75	2,27
	mediana	1,93	2,04	1,69	1,92	2,00	1,95	1,67	2,06	2,09	1,98	0,92	1,91
Mg	$\bar{X}$	0,92	0,90	1,02	0,89	1,00	0,92	1,01	0,98	0,92	0,96	1,13	0,82
	SD	0,09	0,10	0,20	0,12	0,09	0,17	0,16	0,11	0,09	0,16	0,23	0,13
	Min.	0,71	0,73	0,74	0,70	0,87	0,62	0,80	0,78	0,73	0,75	0,78	0,54
	Max.	1,04	1,04	1,40	1,05	1,16	1,34	1,42	1,20	1,10	1,44	1,55	1,05
	mediana	0,93	0,90	1,02	0,91	0,98	0,88	0,98	0,98	0,92	0,92	1,12	0,83
ALP	$\bar{X}$	38,67	44,15	52,14	36,86	50,38	52,07	55,27	37,50	37,57	39,43	50,43	38,71
	SD	14,31	14,38	17,15	11,56	24,76	25,46	15,13	12,40	10,13	10,55	13,77	11,27
	Min.	24	25	27	20	27	32	37	22	23	29	33	25
	Max.	68	79	96	66	124	129	82	71	59	59	78	63
	mediana	34,00	43,00	49,00	37,00	44,50	44,00	54,64	37,25	35,00	36,00	49,00	37,00
bALP	$\bar{X}$	12,80	15,89	28,41	28,65	14,96	13,78	30,83	24,38	13,20	18,67	26,77	26,79
	SD	3,54	7,46	10,70	6,47	4,53	7,93	8,35	4,98	4,15	8,42	7,93	7,73
	Min.	5,80	3,80	14,70	18,00	8,00	4,40	16,80	16,20	6,20	8,30	13,80	15,60
	Max.	22,30	31,60	55,30	40,40	26,00	28,80	45,20	32,20	22,80	34,20	39,40	47,80
	mediana	12,70	15,89	26,80	30,10	14,80	12,05	27,90	24,38	12,50	16,73	28,10	25,25

Tabela 12 nadaljevanje

Parameter	Skupina	I (n = 15)				II (n = 14)				III (n = 14)			
	Odvzem	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
CTx	$\overline{X}$	0,090	0,164	0,740	1,226	0,246	0,110	0,627	1,021	0,136	0,159	0,488	1,224
	SD	0,051	0,164	0,411	0,548	0,186	0,057	0,251	0,724	0,109	0,082	0,365	0,744
	Min.	0,011	0,011	0,116	0,323	0,090	0,021	0,261	0,323	0,011	0,011	0,065	0,404
	Max.	0,178	0,659	1,500	2,300	0,784	0,236	1,010	2,810	0,340	0,295	1,280	3,130
	mediana	0,072	0,120	0,743	1,340	0,172	0,109	0,607	0,691	0,097	0,164	0,291	1,120
estradiol	$\overline{X}$	0,229	1,202	0,322	0,095	0,257	1,229	0,210	0,120	0,195	1,135	0,295	0,130
	SD	0,106	0,854	0,311	0,035	0,098	0,827	0,198	0,036	0,068	0,768	0,205	0,066
	Min.	0,082	0,291	0,070	0,070	0,142	0,280	0,070	0,070	0,120	0,378	0,081	0,070
	Max.	0,390	3,450	0,900	0,178	0,450	2,910	0,686	0,222	0,345	2,820	0,666	0,330
	mediana	0,237	0,987	0,118	0,082	0,230	0,853	0,138	0,120	0,162	0,892	0,208	0,117

Tabela 13: Opisna statistika biokemijskih parametrov pri skupini 13 krav (IV skupina), ki so po drugem odvzemu dobile visok odmerek vitamina D_3

Parameter	**Skupina**	**IV (n = 13)**			
	Odvzem	**1**	**2**	**3**	**4**
Ca	$\overline{X}$	2,27	2,31	1,95	2,33
	SD	0,11	0,08	0,34	0,12
	Min.	2,14	2,17	1,32	2,16
	Max.	2,48	2,46	2,34	2,52
	mediana	2,25	2,30	1,99	2,33
aP	$\overline{X}$	2,11	2,20	1,86	2,06
	SD	0,31	0,35	0,47	0,53
	Min.	1,62	1,44	1,37	1,28
	Max.	2,98	2,85	2,81	3,03
	mediana	2,10	2,17	1,66	1,93
Mg	$\overline{X}$	0,93	0,90	0,90	0,88
	SD	0,11	0,10	0,12	0,08
	Min.	0,75	0,74	0,69	0,75
	Max.	1,11	1,06	1,10	1,00
	mediana	0,95	0,88	0,93	0,86
ALP	$\overline{X}$	37,46	42,15	55,54	35,23
	SD	15,71	11,07	24,71	13,36
	Min.	26	30	35	23
	Max.	82	64	112	66
	mediana	32,00	39,00	45,00	33,00
bALP	$\overline{X}$	15,11	14,70	25,84	26,38
	SD	5,75	7,27	7,53	5,60
	Min.	7,20	7,33	15,10	18,20
	Max.	29,20	27,30	38,60	38,00
	mediana	14,10	12,00	25,20	25,20
CTx	$\overline{X}$	0,231	0,187	0,471	1,842
	SD	0,092	0,186	0,328	1,869
	Min.	0,080	0,019	0,010	0,561
	Max.	0,423	0,750	1,150	6,480
	mediana	0,210	0,130	0,410	0,873
estradiol	$\overline{X}$	0,206	1,659	0,687	0,117
	SD	0,077	1,383	1,787	0,033
	Min.	0,150	0,565	0,101	0,070
	Max.	0,415	5,300	6,630	0,210
	mediana	0,160	1,310	0,179	0,107

4.2 VPLIV LETNEGA ČASA IN POPORODNE HIPOKALCEMIČNE PAREZE NA VREDNOSTI BIOKEMIJSKIH PARAMTEROV OB RAZLIČNIH ODVZEMIH

Večina biokemijskih parametrov je bila znotraj referenčnih vrednosti za odraslo govedo, Ca = 2,25 – 2,99 mmol/L, aP = 1,61 – 2,25 mmol/L, Mg = 0,69 – 1,23 mmol/L, ALP < 200 U/L (Jazbec, 1990), za 17β estradiol, bALP in CTx pa fiziološke vrednosti za govedo v nam dostopni literaturi nismo zasledili. Vrednosti biokemijskih parametrov za vse štiri odvzeme (1. približno 1 mesec pred telitvijo, 2. znotraj 10 dni pred telitvijo, 3. znotraj 48 ur po telitvi, 4. 10 do 20 dni po telitvi) pri poletni, zimski, in skupini krav s poporodno parezo, so prikazane v tabeli 12.

Sklep za vsebnost Ca:

V tabeli 14 so prikazane vrednosti Ca ($\overline{X}$±SD) pri treh skupinah krav po odvzemih ter statistična pomembnost razlik med posameznimi skupinami in odvzemi.

Tabela 14: Aritmetična sredina ± SD in statistična pomembnost razlik meritev Ca po odvzemih (fizioloških obdobjih) pri skupini 15 krav v poletnem obdobju (skupina I), 14 krav v zimskem obdobju (skupina II) in 14 krav s hipokalcemično poporodno parezo (skupina III)

	Skupina krav			
Ca (mmol/L)	I[c]	II[d]	III[e]	Skupaj [b]
Odvzem 1	2,48 ± 0,12	2,33 ± 0,11	2,38 ± 0,13	2,39 ± 0,13
Odvzem 2	2,35 ± 0,10	2,22 ± 0,21	2,25 ± 0,15	2,27 ± 0,13
Odvzem 3	1,94 ± 0,27	2,04 ± 0,18	1,16 ± 0,32	1,71 ± 0,26
Odvzem 4	2,34 ± 0,11	2,28 ± 0,11	2,20 ± 0,18	2,28 ± 0,13
Skupaj [a]	2,28 ± 0,12	2,22 ± 0,22	2,00 ± 0,21	

[a] Primerjava med skupinama 1-3 in 2-3 (p<0,001)
[b] Primerjava med odvzemi 1-2, 1-3, 1-4, 2-3 in 3-4 (p<0,001)
[c] Skupina 1: primerjava med odvzemi 1-2, 2-3 (p<0,01) in 1-3 (p<0,001)
[d] Skupina 2: primerjava med odvzemi 3-4 (p<0,01) in 1-3 (p<0,001)
[e] Skupina 3: primerjava med odvzemi 1-4 (p<0,01) ter 1-3, 2-3 in 3-4 (p<0,001)

1. Interakcija med dejavnikoma Odvzemi in Skupine je bila statistično značilna (F(5,33, 106,55)=17,44, p<0,001) (tabeli 14 in 15). To pomeni, da se je povprečna vrednost serumskega Ca razlikovala med odvzemi pri poletni skupini krav drugače kot pri zimski skupini oz. kot pri skupini krav s parezo.

2. Statistično značilna razlika v povprečni vrednosti serumskega Ca se je pokazala tudi glede na dejavnik Odvzemi (F(2,66, 106,55)=135,64, p<0,001) (tabela 15). To pomeni, da če ne upoštevamo vpliva dejavnika Skupine, lahko pri stopnji zanesljivosti 0,05 trdimo, da se povprečna vrednost serumskega Ca statistično značilno razlikuje med odvzemi (F(2,66, 106,55)=135,64, p<0,001). Analiza kontrastov je pokazala, da je bila povprečna vrednost serumskega Ca statistično značilno nižja pri odvzemu 2 kot pri odvzemu 1 (F(1, 40)=27,01, p<0,001), pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 2 (F(1, 40)=141,54, p<0,001), ter statistično značilno višja pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 3 (F(1, 40)=155,51, p<0,001).

Tabela 15: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Odvzemi in za interakcijo Odvzemi*Skupine za parameter Ca

Vir variabilnosti za Ca	Stopinje prostosti	Vsota kvadriranih odklonov	Srednji kvadrirani odklon	F-statistika	p- vrednost
Odvzemi	2,66	168,20	63,14	135,64	<0,001
Odvzemi*Skupine	5,33	43,24	8,12	17,44	<0,001
Ostanek	106,55	49,60	0,47		

3. Prav tako se je pokazala statistično značilna razlika v povprečni vrednosti dejavnika Ca glede na dejavnik Skupine (F(2, 40)=21,84, p<0,001) (tabela 16). To pomeni, da če ne upoštevamo vpliva dejavnika Odvzemi, lahko pri stopnji zanesljivosti 0,05 trdimo, da se povprečna vrednost serumskega Ca statistično značilno razlikuje med skupinami (F(2, 40)=21,84, p<0,001).

Tabela 16: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Skupine za parameter Ca

Vir variabilnosti za Ca	Stopinje prostosti	Vsota kvadriranih odklonov	Srednji kvadrirani odklon	F-statistika	p- vrednost
Skupine	2	7,14	3,57	21,84	<0,001
Ostanek	40	6,54	0,16		

4. Vendar moramo zaradi signifikantne interakcije med dejavnikoma Odvzemi in Skupine razložiti njun vpliv na povprečno vrednost serumskega Ca z razčlenitvijo te interakcije (tabeli 14 in 15). Da bi lahko razložili interakcijo med dejavnikoma, smo naredili kontraste. Prvi kontrast, s katerim smo analizirali razlike v povprečni vrednosti serumskega Ca med odvzemom 1 in 2, ni bil statistično značilen ($F(2, 40)=0,20$, $p>0,05$). To pomeni, da se je povprečna vrednost serumskega Ca med odvzemoma 1-2 statistično značilno razlikovala, vendar pri vseh treh skupinah enako. Iz tabele 14 vidimo, da je bila povprečna vrednost serumskega Ca pri odvzemu 2 značilno nižja kot pri odvzemu 1.

Nasprotno pa sta bila statistično značilna tako drugi kontrast, ki je analiziral razlike v povprečni vrednosti serumskega Ca med odvzemoma 2-3 ($F(2, 40)=24,28$, $p<0,001$), in tretji kontrast med odvzemoma 3-4 ($F(2, 40)=18,74$, $p<0,001$). Poleg tega so mnogotere primerjave po Tukey-ju pokazale, da se povprečne vrednosti serumskega Ca razlikujejo le med odvzemoma 1-3 (povprečna razlika=0,97, $p<0,001$) in 2-3 (povprečna razlika=0,67, $p<0,001$). To pomeni, da smo za povprečno vrednost serumskega Ca pri skupini krav s parezo pri 3. odvzemu zabeležili statistično značilno večji znižanje glede na 2. odvzem kot pri poletni ali zimski skupini krav. Za povprečno vrednost serumskega Ca pa smo hkrati zabeležili statistično značilno večje povišanje od 3. do 4. odvzema pri skupini krav s parezo kot pri poletni ali zimski skupini krav.

5. Primerjavo povprečnih vrednosti serumskega Ca med odvzemi smo izvedli tudi za vsako posamezno skupino krav (tabela 14).

Pri poletni skupini krav so bili statistično značilni vsi trije kontrasti: 1-2, 2-3 in 3-4; parne primerjave z Bonferronijevo korekcijo pa so pokazale statistično značilne razlike tudi med odvzemoma 1-3. In sicer: povprečna vrednost serumskega Ca je bila statistično značilno nižja

pri odvzemu 2 kot pri odvzemu 1 (F(1, 14)=18,23, p=0,01), pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 2 (F(1, 14)=28,34, p<0,001) in pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 1 (povprečna razlika=2,33, p<0,001) ter statistično značilno višja pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 3 (F(1, 14)=26,06, p<0,001).

Tudi pri zimski skupini krav so bili statistično značilni vsi trije kontrasti; parne primerjave z Bonferronijevo korekcijo pa so pokazale statistično značilne razlike med odvzemoma 1-3. Povprečna vrednost serumskega Ca je bila statistično značilno nižja pri odvzemu 2 kot pri odvzemu 1 (F(1, 13)=5,17, p<0,05), pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 2 (F(1, 13)=7,05, p<0,05) in pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 1 (povprečna razlika=1,23, p<0,001), ter statistično značilno višja pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 3 (F(1, 13)=23,98, p<0,001).

Pri skupini krav s parezo smo prav tako ugotovili statistično značilnost pri vseh treh kontrastih ter dodatno pri primerjavi z Bonferronijevo korekcijo še med odvzemoma 1-3 in 1-4. Povprečna vrednost serumskega Ca je bila statistično značilno nižja pri odvzemu 2 kot pri odvzemu 1 (F(1, 13)=7,99, p<0,05), pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 2 (F(1, 13)=172,35, p<0,001), pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 1 (povprečna razlika=4,22, p<0,001) in pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 1 (povprečna razlika=0,78, p<0,01) ter statistično značilno višja pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 3 (F(1, 13)=136,51, p<0,001).

Sklep za vsebnost aP:

V tabeli 17 so prikazane povprečne vrednosti aP ($\overline{X}$±SD) pri treh skupinah krav po odvzemih ter statistična pomembnost razlik vrednosti med posameznimi skupinami in odvzemi.

Tabela 17: Aritmetična sredina ± SD in statistična pomembnost razlik meritev aP po odvzemih (fizioloških obdobjih) pri skupini 15 krav v poletnem obdobju (skupina I), 14 krav v zimskem obdobju (skupina II) in 14 krav s hipokalcemično poporodno parezo (skupina III)

	Skupina krav			
aP (mmol/L)	I[c]	II[d]	III[e]	Skupaj [b]
Odvzem 1	1,98 ± 0,35	2,13 ± 0,27	2,09 ± 0,30	2,07 ± 0,32
Odvzem 2	2,02 ± 0,34	1,90 ± 0,35	1,99 ± 0,24	1,97 ± 0,32
Odvzem 3	1,77 ± 0,49	1,71 ± 0,53	0,93 ± 0,43	1,47 ± 0,46
Odvzem 4	1,91 ± 0,27	2,10 ± 0,35	1,86 ± 0,33	1,96 ± 0,32
Skupaj [a]	1,92 ± 0,42	1,96 ± 0,45	1,72 ± 0,46	

[a] Primerjava med skupinama 1-3 ($p<0,05$) in 2-3 ($p<0,01$)
[b] Primerjava med odvzemi 1-3, 2-3 in 3-4 ($p<0,001$)
[c] Skupina 1: razlika med odvzemi ni statistično značilna ($p>0,05$)
[d] Skupina 2: razlika med odvzemi ni statistično značilna ($p>0,05$)
[e] Skupina 3: primerjava med odvzemi 1-3, 2-3 in 3-4 ($p<0,001$)

1. Interakcija med dejavnikoma Odvzemi in Skupine je bila statistično značilna ($F(6, 120)=7,02$, $p<0,001$). To pomeni, da se je povprečna vrednost serumskega aP razlikovala med odvzemi pri poletni skupini krav drugače kot pri zimski skupini oz. kot pri skupini krav s parezo (tabeli 17 in 18).

2. Statistično značilna razlika v povprečni vrednosti serumskega aP se je pokazala tudi glede na dejavnik Odvzemi ($F(3, 120)=25,42$, $p<0,001$) (tabeli 17 in 18). To pomeni, da če ne upoštevamo vpliva dejavnika Skupine, lahko pri stopnji zanesljivosti 0,05 trdimo, da se povprečna vrednost serumskega aP statistično značilno razlikuje med odvzemi ($F(3, 120)=25,42$, $p<0,001$). Analiza kontrastov je pokazala, da je bila povprečna vrednost serumskega aP statistično značilno nižja pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 2 ($F(1, 40)=38,54$, $p<0,001$), ter statistično značilno višja pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 3 ($F(1, 40)=36,73$, $p<0,001$).

Tabela 18: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Odvzemi in za interakcijo Odvzemi*Skupine za parameter aP

Vir variabilnosti za aP	Stopinje prostosti	Vsota kvadriranih odklonov	Srednji kvadrirani odklon	F-statistika	p- vrednost
Odvzemi	3	9,25	3,08	25,42	<0,001
Odvzemi*Skupine	6	5,10	0,85	7,02	<0,001
Ostanek	120	14,55	0,12		

3. Prav tako se je pokazala statistično značilna razlika v povprečni vrednosti dejavnika aP glede na dejavnik Skupine ($F(2, 40)=5,57$, $p<0,01$) (tabeli 17 in 19). To pomeni, da če ne upoštevamo vpliva dejavnika Odvzemi, lahko pri stopnji zanesljivosti 0,05 trdimo, da se povprečna vrednost serumskega aP statistično značilno razlikuje med skupinami ($F(2, 40)=5,57$, $p<0,01$).

Tabela 19: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Skupine za parameter aP

Vir variabilnosti za aP	Stopinje prostosti	Vsota kvadriranih odklonov	Srednji kvadrirani odklon	F-statistika	p- vrednost
Skupine	2	1,92	0,96	5,57	0,007
Ostanek	40	6,89	0,17		

4. Vendar moramo zaradi signifikantne interakcije med dejavnikoma Odvzemi in Skupine razložiti njun vpliv na povprečno vrednost serumskega aP z razčlenitvijo te interakcije. Da bi lahko razložili interakcijo med dejavnikoma, smo naredili kontraste. Prvi kontrast, s katerim smo pri interakciji analizirali razlike v povprečni vrednosti serumskega aP med odvzemom 1 in 2, ni bil statistično značilen ($F(2, 40)=1,38$, $p>0,05$). Statistično neznačilen je bil tudi kontrast med odvzemom 1 in odvzemom 2, izračunan za dejavnik Odvzemi ($F(1, 40)=1,96$,

p>0,05). To pomeni, da se povprečna vrednost serumskega aP med odvzemom 1 in 2 ni statistično značilno razlikovala, kar velja za vse tri skupine enako (tabela 17).

Nasprotno pa sta bila statistično značilna drugi kontrast, ki je analiziral razlike v povprečni vrednosti serumskega aP med odvzemoma 2-3 (F(2, 40)=12,02, p<0,001), in tretji kontrast med odvzemoma 3-4 (F(2, 40)=8,55, p=0,001). Poleg tega so mnogotere primerjave po Tukey-ju pokazale, da se povprečne vrednosti serumskega aP razlikujejo le med skupinama 1-3 (povprečna razlika=0,20, p<0,05) in 2-3 (povprečna razlika=0,24, p<0,01). To pomeni, da smo za povprečno vrednost serumskega aP pri skupini krav s parezo pri 3. odvzemu zabeležili statistično značilno večje znižanje glede na 2. odvzem, kot pri poletni ali zimski skupini krav. Za povprečno vrednost serumskega aP pa smo hkrati zabeležili statistično značilno večje zvišanje od 3. do 4. odvzema pri skupini krav s parezo kot pri poletni ali zimski skupini krav (tabela 17).

5. Primerjavo povprečnih vrednosti serumskega aP med odvzemi smo izvedli tudi za vsako posamezno skupino krav (tabela 17).

Pri poletni skupini krav ni bil noben kontrast statistično značilen (p>0,05). Le pri drugem kontrastu (t.j. med odvzemom 2-3) je bila p vrednost blizu 0,05 (p=0,07). To pomeni, da pri stopnji značilnosti 0,05 ne moremo potrditi statistično značilnih razlik v povprečni vrednosti serumskega aP med štirimi odvzemi.

Pri zimski skupini krav se je povprečna vrednost serumskega aP statistično značilno razlikovala le med odvzemoma 3 in 4: pri odvzemu 4 je bila povprečna vrednost serumskega aP statistično značilno višja kot pri odvzemu 3 (F(1, 13)=6,81, p<0,05).

Pri skupini krav s parezo je bila povprečna vrednost serumskega aP statistično značilno nižja pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 2 (F(1, 13)=77,83, p<0,001) in pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 1 (povprečna razlika=1,16, p<0,001), ter statistično značilno višja pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 3 (F(1, 13)=33,05, p<0,001).

Sklep za vsebnost Mg:

V tabeli 20 so prikazane povprečne vrednosti Mg ($\overline{X}$±SD) pri treh skupinah krav po odvzemih ter statistična pomembnost razlik vrednosti med posameznimi skupinami in odvzemi.

Tabela 20: Aritmetična sredina ± SD in statistična pomembnost razlik meritev Mg po odvzemih (fizioloških obdobjih) pri skupini 15 krav v poletnem obdobju (skupina I), 14 krav v zimskem obdobju (skupina II) in 14 krav s hipokalcemično poporodno parezo (skupina III)

	Skupina krav			
Mg (mmol/L)	I[c]	II[d]	III[e]	Skupaj [b]
Odvzem 1	0,92 ± 0,08	1,00 ± 0,09	0,92 ± 0,09	0,95 ± 0,07
Odvzem 2	0,90 ± 0,12	0,92 ± 0,17	0,96 ± 0,16	0,93 ± 0,13
Odvzem 3	1,02 ± 0,19	1,01 ± 0,16	1,13 ± 0,23	1,06 ± 0,20
Odvzem 4	0,89 ± 0,12	0,98 ± 0,11	0,82 ± 0,13	0,90 ± 0,13
Skupaj [a]	0,94 ± 0,20	0,98 ± 0,21	0,96 ± 0,22	

[a] Razlika med skupinami ni statistično značilna (p>0,05)
[b] Primerjava med odvzemi 1-3, 2-3 (p<0,01) in 3-4 (p<0,001)
[c] Skupina 1: primerjava med odvzemoma 3-4 (p<0,05)
[d] Skupina 2: razlika med odvzemi ni statistično značilna (p>0,05)
[e] Skupina 3: primerjava med odvzemi 1-3 in 3-4 (p<0,05)

1. Interakcija med dejavnikoma Odvzemi in Skupine je bila statistično značilna (F(5,32; 106,37)=3,53, p<0,01) (tabela 21). To pomeni, da se je povprečna vrednost serumskega Mg razlikovala med odvzemi pri poletni skupini krav drugače kot pri zimski skupini oz. kot pri skupini krav s parezo.

2. Statistično značilna razlika v povprečni vrednosti serumskega Mg se je pokazala tudi glede na dejavnik Odvzemi (F(2,66, 106,37)=12,39, p<0,001) (tabeli 20 in 21). To pomeni, da če ne upoštevamo vpliva dejavnika Skupine, lahko pri stopnji zanesljivosti 0,05 trdimo, da se povprečna vrednost serumskega Mg statistično značilno razlikuje med odvzemi (F(2,66, 106,37)=12,39, p<0,001). Analiza kontrastov je pokazala, da je bila povprečna vrednost serumskega Mg statistično značilno višja pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 2 (F(1, 40)=18,39, p<0,001), ter statistično značilno nižja pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 3 (F(1, 40)=20,58, p<0,001).

Tabela 21: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Odvzemi in za interakcijo Odvzemi*Skupine za parameter Mg

Vir variabilnosti za Mg	Stopinje prostosti	Vsota kvadriranih odklonov	Srednji kvadrirani odklon	F-statistika	p- vrednost
Odvzemi	2,66	0,61	0,23	12,39	<0,001
Odvzemi*Skupine	5,32	0,35	0,07	3,53	0,005
Ostanek	106,37	1,97	0,02		

3. Na osnovi izračunov pa ne moremo potrditi statistično značilne razlike v povprečni vrednosti dejavnika Mg glede na dejavnik Skupine ($F(2, 40)=0,82$, $p>0,05$) (tabela 22). To pomeni, da če ne upoštevamo vpliva dejavnika Odvzemi, pri stopnji zanesljivost 0.05 ne moremo trditi, da se povprečna vrednost serumskega Mg med skupinami statistično značilno razlikuje ($F(2, 40)=0,82$, $p>0,05$).

Tabela 22: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Skupine za parameter Mg

Vir variabilnosti za Mg	Stopinje prostosti	Vsota kvadriranih odklonov	Srednji kvadrirani odklon	F-statistika	p- vrednost
Skupine	2	0,06	0,028	0,82	0,450
Ostanek	40	1,36	0,034		

4. Ker je med dejavnikoma Odvzemi in Skupine statistično značilna interakcija, jo razložimo s pomočjo kontrastov. Statistično značilen je bil le tretji kontrast, t.j. med odvzemom 3 in 4: to pomeni, da se je povprečna vrednost serumskega Mg od odvzema 3 do odvzema 4 statistično značilno različno znižala pri posameznih skupinah krav ($F(2, 40)=5,58$, $p<0,01$). Glede na tabelo (20) predvidevamo, da je bilo znižanje povprečne vrednosti serumskega Mg pri odvzemu 4 glede na odvzem 3 bistveno večji pri kravah s parezo v primerjavi z drugimi kravami (tabeli 20 in 21).

5. Primerjavo povprečnih vrednosti serumskega Mg med odvzemi smo izvedli tudi za vsako posamezno skupino krav (tabela 20).

Pri poletni skupini krav sta bila statistično značilna drugi in tretji kontrast: povprečna vrednost serumskega Mg je bila statistično značilno višja pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 2 ($F(1, 14)=8,70$, $p<0,05$) ter statistično značilno nižja pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 3 ($F(1, 14)=12,86$, $p<0,005$).

Pri zimski skupini krav ni bilo mogoče potrditi statistično značilno različne povprečne vrednosti serumskega Mg med odvzemi ($p<0,05$).

Pri skupini krav s parezo je bila povprečna vrednost serumskega Mg statistično značilno višja pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 2 ($F(1, 13)=6,96$, $p<0,05$) in pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 1 (povprečna razlika=-0,21, $p<0,05$) ter statistično značilno nižja pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 3 ($F(1, 13)=1,32$, $p<0,005$).

Sklep za aktivnost ALP:

V tabeli 23 so prikazane povprečne vrednosti ALP ($\overline{X}$±SD) pri treh skupinah krav po odvzemih ter statistična pomembnost razlik vrednosti med posameznimi skupinami in odvzemi.

Tabela 23: Aritmetična sredina ± SD in statistična pomembnost razlik meritev ALP po odvzemih (fizioloških obdobjih) pri skupini 15 krav v poletnem obdobju (skupina I), 14 krav v zimskem obdobju (skupina II) in 14 krav s hipokalcemično poporodno parezo (skupina III)

	Skupina krav			
ALP (U/L)	I[c]	II[d]	III[e]	Skupaj [b]
Odvzem 1	38,67 ± 14,29	50,38 ± 24,76	37,57 ± 10,13	42,21 ± 17,44
Odvzem 2	44,15 ± 14,37	52,07 ± 25,46	39,43 ± 10,55	45,22 ± 17,90
Odvzem 3	52,14 ± 17,16	55,27 ± 15,13	50,43 ± 13,77	52,62 ± 15,47
Odvzem 4	36,86 ± 11,58	37,50 ± 12,14	38,71 ± 11,27	37,69 ± 11,74
Skupaj [a]	42,96 ± 25,82	48,81 ± 25,49	41,54 ± 25,42	

[a] Razlika med skupinami ni statistično značilna ($p>0,05$)
[b] Primerjava med odvzemi 1-3 ($p<0,01$), 2-3, 2-4 ($p<0,05$) in 3-4 ($p<0,001$)
[c] Skupina 1: primerjava med odvzemi 1-3, 3-4 ($p<0,01$) ter 2-3 in 2-4 ($p<0,05$)
[d] Skupina 2: primerjava med odvzemoma 3-4 ($p<0,001$)
[e] Skupina 3: primerjava med odvzemi 1-3, 2-3 in 3-4 ($p<0,05$)

1. Glavni učinek dejavnika Odvzemi je bil statistično značilen (F(1,76, 70,28)=14,72, p<0,001), učinek interakcije med dejavnikoma Odvzemi in Skupine pa ne (F(3,51, 70,28)=1,59, p>0,05) (tabela 24). Zato interpretiramo oba glavna učinka (za dejavnik Odvzemi in dejavnik Skupine) ločeno.

To pomeni, da so se povprečne vrednosti serumske ALP med odvzemi statistično značilno razlikovale (F(1,76, 70,28)=14,72, p<0,001), brez signifikantne razlike glede na skupino krav (F(3,51, 70,28)=1,59, p>0,05) (tabela 23).

Razlike med posameznimi odvzemi smo ovrednotili s kontrasti. Statistično značilni so bili vsi trije kontrasti: povprečna vrednost serumske ALP je bila statistično značilno višja pri odvzemu 2 kot pri odvzemu 1 (F(1, 40)=4,98, p<0,05) in pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 2 (F(1, 40)=8,34, p<0,01), ter statistično značilno nižja pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 3 (F(1, 40)=79,06, p<0,001) (tabela 23).

Parne primerjave ocenjenih robnih povprečij z Bonferronijevo korekcijo so pokazale, da je bila statistično značilna razlika tudi med odvzemi 1-3 (povprečna razlika=-10,41, p<0,01) ter 2-4 (povprečna razlika=7,40, p<0,05) (tabela 23).

Tabela 24: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Odvzemi in za interakcijo Odvzemi*Skupine za parameter ALP

Vir variabilnosti za ALP	Stopinje prostosti	Vsota kvadriranih odklonov	Srednji kvadrirani odklon	F-statistika	p- vrednost
Odvzemi	1,76	5067,38	2884,28	14,72	<0,001
Odvzemi*Skupine	3,51	1090,91	310,46	1,59	0,194
Ostanek	70,28	13768,18	195,92		

2. Glavni učinek dejavnika Skupine ni bil statistično značilen (F(2, 40)=1,27, p>0,05) (tabela 25). To pomeni, da na osnovi rezultatov ne moremo potrditi statistično značilne razlike v povprečni vrednosti serumske ALP med poletno in zimsko skupino krav in skupino krav s parezo (F(2, 40)=1,27, p>0,05).

Tabela 25: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Skupine za parameter ALP

Vir variabilnosti za ALP	Stopinje prostosti	Vsota kvadriranih odklonov	Srednji kvadrirani odklon	F-statistika	p- vrednost
Skupine	2	1672,40	836,20	1,27	0,291
Ostanek	40	26252,61	656,32		

3. Primerjavo povprečnih vrednosti serumske ALP med odvzemi smo izvedli tudi za vsako posamezno skupino krav (tabela 23).

Pri poletni skupini krav so bili statistično značilni vsi trije kontrasti, parne primerjave z Bonferronijevo korekcijo pa so pokazale statistično značilne razlike tudi med odvzemi 1-3 in 2-4: povprečna vrednost serumske ALP je bila statistično značilno višja pri odvzemu 2 kot pri odvzemu 1 ($F(1, 14)=6,82$, $p<0,05$), pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 2 ($F(1, 14)=13,50$, $p<0,005$) in pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 1 (povprečna razlika=-13,48, $p<0,01$) ter statistično značilno nižja pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 3 ($F(1, 14)=26,45$, $p<0,001$) in pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 2 (povprečna razlika=7,30, $p<0,05$).

Pri zimski skupini krav je bila povprečna vrednost serumske ALP statistično značilno nižja pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 3 ($F(1, 13)=55,02$, $p<0,001$).

Pri skupini krav s parezo je bila povprečna vrednost serumske ALP statistično značilno višja pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 2 ($F(1, 13)=9,91$, $p<0,01$) in pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 1 (povprečna razlika=-12,86, $p<0,05$) ter statistično značilno nižja pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 3 ($F(1, 13)=12,87$, $p<0,005$).

Sklep za aktivnost bALP:

V tabeli 26 so prikazane povprečne vrednosti aktivnosti bALP ($\overline{X}\pm SD$) pri treh skupinah krav po odvzemih ter statistična pomembnost razlik vrednosti med posameznimi skupinami in odvzemi.

Tabela 26: Aritmetična sredina ± SD in statistična pomembnost razlik meritev bALP po odvzemih (fizioloških obdobjih) pri skupini 15 krav v poletnem obdobju (skupina I), 14 krav v zimskem obdobju (skupina II) in 14 krav s hipokalcemično poporodno parezo (skupina III)

	Skupina krav			
bALP (U/L)	1[c]	2[d]	3[e]	Skupaj [b]
Odvzem 1	12,80 ± 3,49	14,96 ± 4,53	13,20 ± 4,15	13,66 ± 4,07
Odvzem 2	15,89 ± 7,47	13,78 ± 7,93	18,67 ± 8,42	16,11 ± 7,93
Odvzem 3	28,41 ± 10,69	30,83 ± 8,35	26,77 ± 7,93	28,67 ± 9,11
Odvzem 4	28,65 ± 6,47	24,38 ± 4,98	26,79 ± 7,73	26,61 ± 6,49
Skupaj [a]	21,44 ± 8,10	20,99 ± 8,09	21,36 ± 8,15	

[a] Razlika med skupinami ni statistično značilna ($p>0,05$)
[b] Primerjava med odvzemi 1-3, 1-4, 2-3 in 2-4 ($p<0,001$)
[c] Skupina 1: primerjava med odvzemi 1-3, 2-3, 2-4 ($p<0,01$) in 1-4 ($p<0,001$)
[d] Skupina 2: primerjava med odvzemi 1-4 ($p<0,01$) ter 1-3, 2-3 in 2-4 ($p<0,001$)
[e] Skupina 3: primerjava med odvzemi 1-3 in 1-4 ($p<0,001$)

1. Glavni učinek dejavnika Odvzemi je bil statistično značilen ($F(3, 120)=52,25$, $p<0,001$), učinek interakcije med dejavnikoma Odvzemi in Skupine pa ne ($F(6, 120)=1,63$, $p>0,05$) (tabela 27), zato interpretiramo oba glavna učinka (za dejavnik Odvzemi in dejavnik Skupine) ločeno. To pomeni, da so se povprečne vrednosti serumske bALP med odvzemi statistično značilno razlikovale ($F(3, 120)=52,25$, $p<0,001$), brez signifikantne razlike glede na skupino krav ($F(6, 120)=1,63$, $p>0,05$) (tabela 27).

Razlike med posameznimi odvzemi smo ovrednotili s kontrasti. Statistično značilen je bil le drugi kontrast: povprečna vrednost serumske bALP je bila statistično značilno višja pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 2 ($F(1, 40)=62,92$, $p<0,001$).

Parne primerjave ocenjenih robnih povprečij z Bonferronijevo korekcijo so pokazale, da je bila statistično značilna razlika tudi med odvzemi 1-3 (povprečna razlika=-15,02, $p<0,001$), 1-4 (povprečna razlika=-12,95, $p<0,001$), ter 2-4 (povprečna razlika=-10,50, $p<0,001$) (tabela 26).

Tabela 27: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Odvzemi in za interakcijo Odvzemi*Skupine za parameter bALP

Vir variabilnosti za bALP	Stopinje prostosti	Vsota kvadriranih odklonov	Srednji kvadrirani odklon	F-statistika	p- vrednost
Odvzemi	3	7210,34	2403,45	52,25	<0,001
Odvzemi*Skupine	6	448,88	74,81	1,63	0,146
Ostanek	120	5520,44	46,00		

2. Glavni učinek dejavnika Skupine ni bil statistično značilen (F(2, 40)=0,05, p>0,05). To pomeni, da na osnovi rezultatov ne moremo potrditi statistično značilne razlike v povprečni vrednosti serumske bALP med poletno in zimsko skupino krav in skupino krav s parezo (F(2, 40)=0,05, p>0,05) (tabela 28).

Tabela 28: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Skupine za parameter bALP

Vir variabilnosti za bALP	Stopinje prostosti	Vsota kvadriranih odklonov	Srednji kvadrirani odklon	F-statistika	p- vrednost
Skupine	2	6,55	3,27	0,05	0,952
Ostanek	40	2675,27	66,88		

3. Primerjavo povprečnih vrednosti serumske bALP med odvzemi smo izvedli tudi za vsako posamezno skupino krav (tabela 26).

Pri poletni skupini krav je bil statistično značilen le drugi kontrast (2-3), parne primerjave z Bonferronijevo korekcijo pa so pokazale statistično značilne razlike tudi med odvzemi 1-3, 1-4 in 2-4: povprečna vrednost serumske bALP je bila statistično značilno višja pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 2 (F(1, 14)=22,76, p<0,001), pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 1 (povprečna razlika=-15,61, p<0,005), pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 1 (povprečna razlika=-15,85, p<0,001 ter pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 2 (povprečna razlika=-12,76, p=0,001).

Pri zimski skupini krav je bila povprečna vrednost serumske bALP statistično značilno višja pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 2 (F(1, 13)=36,39, p<0,001), pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 1 (povprečna razlika=-15,87, p<0,001), pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 1 (povprečna razlika=-9,42, p<0,005) in pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 2 (povprečna razlika=-10,61, p<0,001) ter statistično značilno nižja pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 3 (F(1, 13)=5,90, p<0,05).

Pri skupini krav s parezo je bila povprečna vrednost serumske bALP statistično značilno višja pri odvzemu 2 kot pri odvzemu 1 (F(1, 13)=8,61, p<0,05), pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 2 (F(1, 13)=8,50, p<0,05), pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 1 (povprečna razlika=-13,57, p<0,001) ter odvzemu 4 kot pri odvzemu 1 (povprečna razlika=-13,59, p<0,001).

Sklep za vsebnost CTx:

V tabeli 29 so prikazane povprečne vrednosti CTx ($\overline{X}$±SD) pri treh skupinah krav po odvzemih ter statistična pomembnost razlik vrednosti med posameznimi skupinami in odvzemi.

Tabela 29: Aritmetična sredina ± SD in statistična pomembnost razlik meritev CTx po odvzemih (fizioloških obdobjih) pri skupini 15 krav v poletnem obdobju (skupina I), 14 krav v zimskem obdobju (skupina II) in 14 krav s hipokalcemično poporodno parezo (skupina III)

	Skupina krav			
CTx (ng/mL)	I[c]	II[d]	III[e]	Skupaj [b]
Odvzem 1	0,090 ± 0,050	0,246 ± 0,186	0,136 ± 0,109	0,157 ± 0,125
Odvzem 2	0,164 ± 0,163	0,110 ± 0,057	0,159 ± 0,082	0,144 ± 0,111
Odvzem 3	0,740 ± 0,410	0,627 ± 0,251	0,488 ± 0,365	0,618 ± 0,347
Odvzem 4	1,226 ± 0,546	1,021 ± 0,724	1,224 ± 0,744	1,157 ± 0,675
Skupaj [a]	0,555 ± 0,625	0,501 ± 0,449	0,502 ± 0,448	

[a] Razlika med skupinami ni statistično značilna (p>0,05)
[b] Primerjava med odvzemi 1-3, 1-4, 2-3, 2-4 in 3-4 (p<0,001)
[c] Skupina 1: primerjava med odvzemi 1-3, 1-4, 2-3, 2-4 (p<0,001) in 3-4 (p<0,05)
[d] Skupina 2: primerjava med odvzemi 1-2 (p<0,01) ter 1-3, 1-4, 2-3 in 2-4 (p<0,001)
[e] Skupina 3: primerjava med odvzemi 1-3 (p<0,01), 1-4, 2-4 (p<0,001) ter 2-3 in 3-4 (p<0,05)

1. Interakcija med dejavnikoma Odvzemi in Skupine je bila statistično značilna (F(6, 120)=3,81, p<0,005) (tabela 30). To pomeni, da se je povprečna vrednost serumskih CTx

razlikovala med odvzemi pri poletni skupini krav drugače kot pri zimski skupini oz. kot pri skupini krav s parezo.

2. Statistično značilna razlika v povprečni vrednosti serumskih CTx se je pokazala tudi glede na dejavnik Odvzemi ($F(3, 120)=113,65$, $p<0,001$) (tabela 30). To pomeni, da če ne upoštevamo vpliva dejavnika Skupine, lahko pri stopnji zanesljivosti 0,05 trdimo, da se povprečna vrednost serumskih CTx statistično značilno razlikuje med odvzemi ($F(3, 120)=113,65$, $p<0,001$). Analiza kontrastov je pokazala, da je bila povprečna vrednost serumskih CTx statistično značilno višja pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 2 ($F(1, 40)=123,91$, $p<0,001$) in pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 3 ($F(1, 40)=27,47$, $p<0,001$) (tabela 29).

Tabela 30: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Odvzemi in za interakcijo Odvzemi*Skupine za parameter CTx

Vir variabilnosti za CTx	Stopinje prostosti	Vsota kvadriranih odklonov	Srednji kvadrirani odklon	F-statistika	p- vrednost
Odvzemi	3	30,23	10,08	113,65	<0,001
Odvzemi*Skupine	6	2,03	0,34	3,81	0,002
Ostanek	120	10,64	0,09		

3. Na osnovi izračunov pa ne moremo potrditi statistično značilne razlike v povprečni vrednosti dejavnika CTx glede na dejavnik Skupine ($F(2, 40)=0,65$, $p>0,05$) (tabela 31). To pomeni, da če ne upoštevamo vpliva dejavnika Odvzemi, pri stopnji zanesljivost 0,05 ne moremo trditi, da se povprečna vrednost serumskih CTx med skupinami statistično značilno razlikuje ($F(2, 40)=0,65$, $p>0,05$).

Tabela 31: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Skupine za parameter CTx

Vir variabilnosti za CTx	Stopinje prostosti	Vsota kvadriranih odklonov	Srednji kvadrirani odklon	F-statistika	p- vrednost
Skupine	2	0,23	0,11	0,65	0,526
Ostanek	40	6,94	0,17		

4. Ker je med dejavnikoma Odvzemi in Skupine statistično značilna interakcija, jo razložimo s pomočjo kontrastov. Statistično značilen je bil le prvi kontrast ($F(2, 40)=4,65$, $p<0,05$), pri drugem kontrastu pa je bila p vrednost blizu 0,05 ($p=0,068$). To pomeni, da je bilo spreminjanje povprečne vrednosti serumskih CTx med odvzemi različno pri različnih skupinah krav. Iz tabele 11 vidimo, da se je povprečna vrednost serumskih CTx pri odvzemu 2 pri kravah v zimskem času znižala glede na vrednost pri odvzemu 1, nasprotno pa se je povprečna vrednost serumskih CTx pri kravah poletne skupine in skupine s parezo zvišala pri odvzemu 2 glede na vrednost pri odvzemu 1. Prav tako se je nakazovala tudi razlika med odvzemom 3 in 2: pri kravah s parezo se je nakazovalo, da se je povprečna vrednost serumskih CTx od odvzema 2 do odvzema 3 zvišala manj kot pri kravah poletne in zimske skupine (tabela 29).

5. Primerjavo povprečnih vrednosti serumskih CTx med odvzemi smo izvedli tudi za vsako posamezno skupino krav.

Pri poletni skupini krav je bila povprečna vrednost serumskih CTx statistično značilno višja pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 2 ($F(1, 14)=71,59$, $p<0,001$), pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 3 ($F(1, 14)=12,95$, $p<0,05$), pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 1 (povprečna razlika=-0,92, $p<0,001$), pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 1 (povprečna razlika=-1,17, $p<0,001$) ter pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 2 (povprečna razlika=-1,01, $p<0,001$).

Pri zimski skupini krav je bila povprečna vrednost serumskih CTx statistično značilno nižja pri odvzemu 2 kot pri odvzemu 1 ($F(1, 13)=18,30$, $p=0,001$) ter statistično značilno višja pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 2 ($F(1, 13)=81,51$, $p<0,001$), pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 1 (povprečna razlika=-0,46, $p<0,001$), pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 1 (povprečna razlika=-0,62, $p<0,001$) ter pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 2 (povprečna razlika=-0,94).

Pri skupini krav s PH je bila povprečna vrednost serumskih CTx statistično značilno višja pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 2 ($F(1, 13)=12,46$, $p<0,005$), pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 3 ($F(1, 13)=13,66$, $p<0,005$), pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 1 (povprečna razlika=-0,65, $p<0,01$), pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 1 (povprečna razlika=-1,10, $p<0,001$) ter pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 2 (povprečna razlika=-0,91, $p<0,001$) (tabela 29).

Sklep za vsebnost estradiola:

V tabeli 32 so prikazane povprečne vrednosti estradiola ($\overline{X}$±SD) pri treh skupinah krav po odvzemih ter statistična pomembnost razlik vrednosti med posameznimi skupinami in odvzemi.

Tabela 32: Aritmetična sredina ± SD in statistična pomembnost razlik meritev estradiola po odvzemih (fizioloških obdobjih) pri skupini 15 krav v poletnem obdobju (skupina I), 14 krav v zimskem obdobju (skupina II) in 14 krav s hipokalcemično poporodno parezo (skupina III)

	Skupina krav			
estradiol (nmol/L)	I[c]	II[d]	III[e]	Skupaj [b]
Odvzem 1	0,229 ± 0,105	0,257 ± 0,098	0,195 ± 0,068	0,227 ± 0,092
Odvzem 2	1,202 ± 0,852	1,229 ± 0,827	1,135 ± 0,768	1,189 ± 0,820
Odvzem 3	0,322 ± 0,310	0,210 ± 0,198	0,295 ± 0,205	0,276 ± 0,243
Odvzem 4	0,095 ± 0,035	0,120 ± 0,036	0,130 ± 0,066	0,115 ± 0,046
Skupaj [a]	0,462 ± 0,525	0,454 ± 0,449	0,439 ± 0,448	

[a] Razlika med skupinami ni statistično značilna ($p>0,05$)
[b] Primerjava med odvzemi 1-2, 1-4, 2-3, 2-4 in 3-4 ($p<0,001$)
[c] Skupina 1: primerjava med odvzemi 1-2, 1-4, 2-3 in 2-4 ($p<0,01$)
[d] Skupina 2: primerjava med odvzemi 1-2, 1-4, 2-3 in 2-4 ($p<0,01$)
[e] Skupina 3: primerjava med odvzemi 1-2, 2-4 ($p<0,01$) ter 2-3 in 3-4 ($p<0,05$)

1. Pri estradiolu predpostavka o homogenosti varianc med skupinami ni izpolnjena, pri estradiolu za 3. odvzem, kljub različnim transformacijam in popravljanju osamelcev. Vendar se rezultati pri vseh omenjenih variantah bistveno ne razlikujejo glede vpliva dejavnika Odvzemi, dejavnika Skupine in njune interakcije: v vseh primerih je interakcija nesignifikantna, vpliv Skupin prav tako, statistično značilne razlike v povprečni vrednosti serumskega estradiola so le glede na odvzeme (tabeli 32 in 33). Pri nadaljnjih točkah navajam

rezultate, ki bi bili korektni, če bi predpostavka o homogenosti varianc med skupinami za 3. odvzem veljala.

2. Glavni učinek dejavnika Odvzemi je bil statistično značilen (F(1,18, 47,15)=58,63, p<0,001), učinek interakcije med dejavnikoma Odvzemi in Skupine pa ne (F(2,36, 47,15)=0,63, p>0,05) (tabela 33). Zato interpretiramo oba glavna učinka (za dejavnik Odvzemi in dejavnik Skupine) ločeno. To pomeni, da so se povprečne vrednosti serumskega estradiola med odvzemi statistično značilno razlikovale (F(1,18, 47,15)=58,63, p<0,001), brez signifikantne razlike glede na skupino krav (F(2,36, 47,15)=0,63, p>0,05) (tabela 33).
Razlike med posameznimi odvzemi smo ovrednotili s kontrasti. Statistično značilni so bili vsi trije kontrasti: povprečna vrednost serumskega estradiola je bila statistično značilno višja pri odvzemu 2 kot pri odvzemu 1 (F(1, 40)=59,41, p<0,001) ter statistično nižja pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 2 (F(1, 40)=53,63, p<0,001) in pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 3 (F(1, 40)=19,36, p<0,001).
Parne primerjave ocenjenih robnih povprečij z Bonferronijevo korekcijo so pokazale, da je bila statistično značilna razlika tudi med odvzemi 1- 4 (povprečna razlika=0,11, p<0,001) in 2-4 (povprečna razlika=1,07, p<0,001) (tabela 32).

Tabela 33: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Odvzemi in za interakcijo Odvzemi*Skupine za parameter estradiol

Vir variabilnosti za estradiol	Stopinje prostosti	Vsota kvadriranih odklonov	Srednji kvadrirani odklon	F-statistika	p- vrednost
Odvzemi	1,18	31,70	26,89	58,63	<0,001
Odvzemi*Skupine	2,36	0,18	0,08	0,17	0,877
Ostanek	47,15	21,63	0,46		

3. Glavni učinek dejavnika Skupine ni bil statistično značilen (F(2, 40)=0,04, p>0,05) (tabela 34). To pomeni, da na osnovi rezultatov ne moremo potrditi statistično značilne razlike v povprečni vrednosti serumskega estradiola med poletno in zimsko skupino krav in skupino krav s PH (F(2, 40)=0,04, p>0,05).

Tabela 34: Rezultati dvosmerne ANOVA s ponavljanjem za dejavnik Skupine za parameter estradiol

Vir variabilnosti za estradiol	Stopinje prostosti	Vsota kvadriranih odklonov	Srednji kvadrirani odklon	F-statistika	p- vrednost
Skupine	2	0,004	0,002	0,041	0,960
Ostanek	40	1,997	0,050		

4. Primerjavo povprečnih vrednosti serumskega estradiola med odvzemi smo izvedli tudi za vsako posamezno skupino krav (tabela 32).

Pri poletni skupini krav je bila povprečna vrednost serumskega estradiola statistično značilno višja pri odvzemu 2 kot pri odvzemu 1 ($F(1, 14)=20,52$, $p<0,001$) ter statistično značilno nižja pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 2 ($F(1, 14)=24,50$, $p<0,001$) in pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 3 ($F(1, 14)=7,79$, $p<0,05$). Parne primerjave z Bonferronijevo korekcijo so pokazale, da se razlikujeta tudi odvzema 1-4 (povprečna razlika=0,13, p=0,001) in odvzema 2-4 (povprečna razlika=1,11, p=0,001).

Pri zimski skupini krav je bila povprečna vrednost serumskega estradiola statistično značilno višja pri odvzemu 2 kot pri odvzemu 1 ($F(1, 13)=18,83$, $p=0,001$) ter statistično značilno nižja pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 2 ($F(1, 13)=17,69$, $p=0,001$). Parne primerjave z Bonferronijevo korekcijo so pokazale, da se razlikujeta tudi odvzema 1-4 (povprečna razlika=0,14, p=0,001) in odvzema 2-4 (povprečna razlika=1,11, $p<0,05$).

Pri skupini krav s parezo je bila povprečna vrednost serumskega estradiola statistično značilno višja pri odvzemu 2 kot pri odvzemu 1 ($F(1, 13)=20,29$, $p=0,001$) ter statistično značilno nižja pri odvzemu 3 kot pri odvzemu 2 ($F(1, 13)=13,67$, $p<0,05$) in pri odvzemu 4 kot pri odvzemu 3 ($F(1, 13)=11,44$, $p=0,05$). Statistično značilna razlika pa je tudi med odvzemoma 2-4 (povprečna razlika=1,00, $p<0,05$).

Povzetek vplivov na nihanje povprečnih vrednosti merjenih parametrov

V tabeli 35 je prikazan povzetek statistične pomembnosti virov variabilnosti na merjene biokemijske parametre.

Tabela 35: Statistična pomembnost virov variabilnosti za nihanja povprečnih vrednosti merjenih parametrov

Vir variabilnosti	Ca	aP	Mg	ALP	bALP	CTx	estradiol
Skupina	++	+	-	-	-	-	-
Odvzem	++	++	++	++	++	++	++
Skupina * Odvzem	++	++	+	-	-	+	-

Legenda: ++ $p<0,001$; + $p<0,05$; - $p>0,05$

4.3 VPLIV DAJANJA VISOKEGA ODMERKA VITAMINA D_3 OB 2. ODVZEMU NA VREDNOSTI Ca, aP, bALP in CTx PRI 3. IN 4. ODVZEMU

Povprečne vrednosti Ca, aP, bALP in CTx se pri prvem in drugem odvzemu niso statistično značilno ($p>0,05$) razlikovale med kravami v zimskem času, ki so dobile po drugem odvzemu vit. D_3 in tistimi, ki ga niso (tabeli 36 in 37).

Za 3. odvzem:

Primerjali smo povprečno vrednost parametrov Ca, aP, bALP in CTx pri 3. odvzemu med kravami, ki so ob 2. odvzemu dobile vitamin D_3, in kravami, ki ga niso dobile. Dvajset krav ni dobilo vitamina D_3 pred telitvijo, 13 krav ga je dobilo. Za obporodno hipokalcemično parezo sta kljub dajanju vitamina D oboleli 2 kravi, v skupini krav, ki ni dobila vitamina D pa je obolelo 6 krav.

Na osnovi rezultatov t testa ne moremo potrditi statistično značilne razlike v povprečni vrednosti serumskega Ca ($t(31)=-1,033$, $p>0,05$), aP ($t(31)=-1,776$, $p=0,086$), bALP ($t(31)=1,980$, $p=0,057$) in CTx ($t(31)=1,308$, $p>0,05$) med kravami, ki so ob drugem odvzemu dobile vitamin D_3, in kravami, ki ga niso dobile (tabela 36).

Tabela 36: Deskriptivna analiza vrednosti Ca, aP, bALP, CTx in statistična pomembnost razlike pri 3. odvzemu (0 do 48 ur PP) v zimskem obdobju; pri kravah, ki so dobile vitamin D_3 in tistih, ki ga niso

	Vitamin D_3	n	$\overline{X}$	SD	t	p
Ca	Ne Da	20 13	1,81 mmol/L 1,95 mmol/L	0,39 mmol/L 0,34 mmol/L	-1,03	>0,05
aP	Ne Da	20 13	1,51 mmol/L 1,86 mmol/L	0,59 mmol/L 0,47 mmol/L	-1,78	0,09
bALP	Ne Da	20 13	31,02 U/L 25,84 U/L	7,22 U/L 7,53 U/L	1,98	0,06
CTx	Ne Da	20 13	0,623 ng/mL 0,471 ng/mL	0,325 ng/mL 0,328 ng/mL	1,31	>0,05

Za 4. odvzem:

Tudi kasneje, pri 4. Odvzemu, ne ugotavljamo statistično značilnih razlik med povprečnimi vrednostmi Ca, aP, CTx in bALP med kravami, ki so dobile vitamin D_3 in tistimi, ki ga niso dobile ob 2. odvzemu. Ker je vzorčna porazdelitev za parameter Ca (pri kravah, ki niso dobile vitamina), aP (pri kravah, ki niso dobile vitamina) in CTx (pri obeh skupinah krav) asimetrična (nenormalna), je korektneje zanje navajati mediano namesto aritmetične sredine. Za primerjanje zanje uporabimo neparametrični test – Mann-Whitney test. Izračunane vrednosti statistike so za Ca U=95,50, p>0,05, aP U=104,00, p>0,05 in CTx U=119,00, p>0,05. Pri parametru bALP uporabimo t test, ki tudi ne pokaže statistično značilne razlike: t(31)=-1.123, p>0.05 (tabela 37).

Tabela 37: Deskriptivna anliza vrednosti Ca, aP, bALP, CTx in p vrednost pri kravah v zimskem obdobju, ki so dobile vitamin D_3 in tiste, ki ga niso, pri 4. odvzemu (10 do 20 dni PP)

	Vitamin D_3	n	$\overline{X}$	SD	25 percentil	Mediana	75 percentil	p
Ca	Ne Da	20 13	2,24 mmol/L 2,33 mmol/L	0,16 mmol/L 0,12 mmol/L	2,18 mmol/L 2,21 mmol/L	2,28 mmol/L 2,33 mmol/L	2,32 mmol/L 2,44 mmol/L	>0,05
aP	Ne Da	20 13	2,05 mmol/L 2,06 mmol/L	0,35 mmol/L 0,53 mmol/L	1,94 mmol/L 1,74 mmol/L	2,04 mmol/L 1,93 mmol/L	2,15 mmol/L 2,42 mmol/L	>0,05
bALP	Ne Da	20 13	24,26 U/L 26,38 U/L	5,11 U/L 5,60 U/L	19,12 U/L 23,10 U/L	24,26 U/L 25,20 U/L	28,75 U/L 30,65 U/L	>0,05
CTx	Ne Da	20 13	1,185 ng/mL 1,842 ng/mL	0,786 ng/mL 1,869 ng/mL	0,625 ng/mL 0,618 ng/mL	0,958 ng/mL 0,873 ng/mL	1,702 ng/mL 2,715 ng/mL	>0,05

4.4 NAPOVEDOVANJE VREDNOSTI Ca PO PORODU (3. ODVZEM) S POMOČJO REZULTATOV VREDNOSTI BIOKEMIJSKIH PARAMETROV bALP IN CTx PRED TELITVIJO (2. ODVZEM)

1. Korelacije biokemičnih parametrov iz 2. odvzema s kalcijem iz 3. odvzema:

Poletna skupina: Ugotovimo, da ne moremo potrditi povezanosti nobenega biokemičnega parametra s kalcijem (le pri CTx vidimo, da je p vrednost blizu 0,05 (p=0,068)).

Zimska skupina: Ugotovimo močno povezanost med bALP in Ca (r=-0,413, p=0,045) ter med CTx in Ca (r=- 0,581, p=0,003).

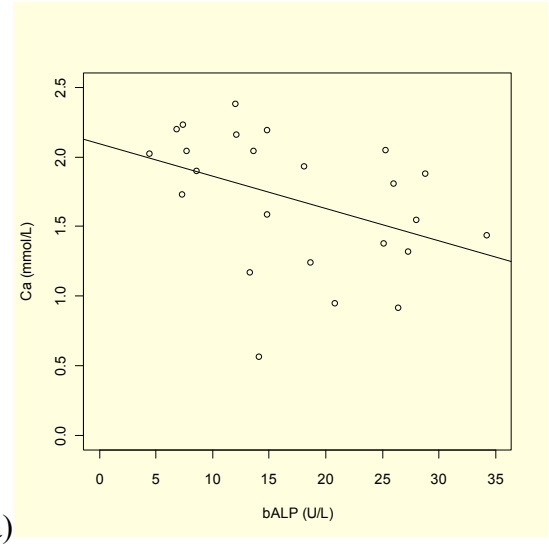
Poletna in zimska skupina skupaj: Ne moremo potrditi statistično značilne korelacije med biokemičnimi parametri, merjenimi ob 2. odvzemu, na vrednost kalcija ob 3. odvzemu.

2. Linearna regresija:

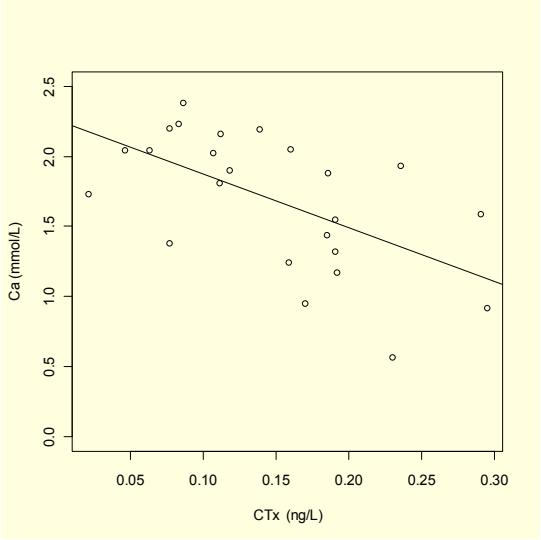
Linearno regresijo smo opravili le za parametra bALP in CTx pri kravah iz zimske skupine, saj se je samo tukaj pokazala signifikantna korelacija s kalcijem.

Za bALP: Koeficient determinacije R^2=0,133, kar pomeni, da parameter bALP pojasni 13,3% variabilnosti parametra Ca. Model je statistično značilno pomemben (F(1,22)=4,51, p=0,045), t.j. parameter bALP statistično značilno vpliva na Ca. Regresijska koeficienta sta: b_0=2,098 in b_1= - 0,023, na osnovi katerih lahko napišemo enačbo regresijske premice: y=2,098 – 0,023*x. Regresijski koeficient za bALP je torej b=-0,023 (95% IZ: -0,046, -0,001))

Za CTx: Koeficient determinacije R^2=0,307, kar pomeni, da parameter CTx pojasni 30,7% variabilnosti parametra Ca. Model je statistično značilno pomemben (F(1,22)=11,19, p=0,003), t.j. parameter CTx statistično značilno vpliva na Ca. Regresijska koeficienta sta: b_0=2,257 in b_1= - 3,823, na osnovi katerih lahko napišemo enačbo regresijske premice: y=2,257 – 3,823*x. Regresijski koeficient za CTx je torej b=-3,823 (95% IZ: -6,193, -1,453).



a)



b)

Grafikon 2 a in b: Regresijski premici, ki prikazujeta odvisnost koncentracije Ca ob 3. odvzemu od koncentracije bALP ob 2. odvzemu (y=2,098 – 0,023*x) in od koncentracije CTx ob 2. odvzemu (y=2,257 – 3,823*x).

3. <u>ROC krivulja:</u>

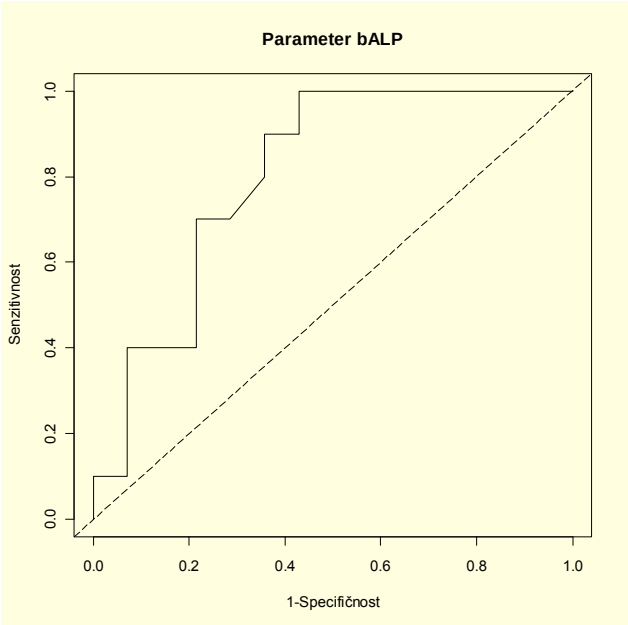
Ugotavljanje specifičnosti in senzitivnosti izmerjenih vrednosti parametra bALP in CTx pri diagnosticiranju poporodne pareze.

Poletna skupina:

Pri poletni skupini ne moremo za noben parameter potrditi statistično značilno večje površine pod ROC krivuljo od 0,5.

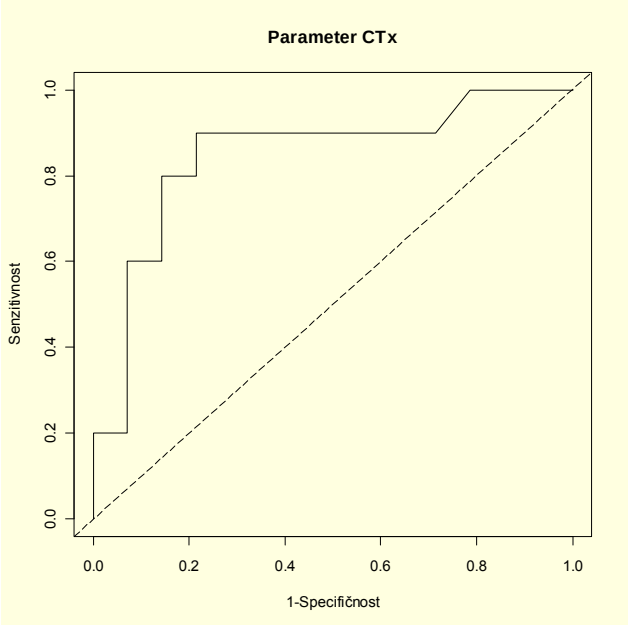
Zimska skupina:

bALP: Diagnostično natančnost vrednosti parametra bALP smo določili s pomočjo površine pod ROC krivuljo – AUC=0,804 (95% IZ: 0,627-0,980; p=0,013). Pri razmejitveni točki (cut-off point) 14,45 U/L je senzitivnost 80% in specifičnost 64,3%; pri razmejitveni točki (cut-off point) 12,70 U/L pa je senzitivnost 100% in specifičnost 57,1%.



Grafikon 3: ROC krivulja za biokemični parameter bALP pri zimski skupini

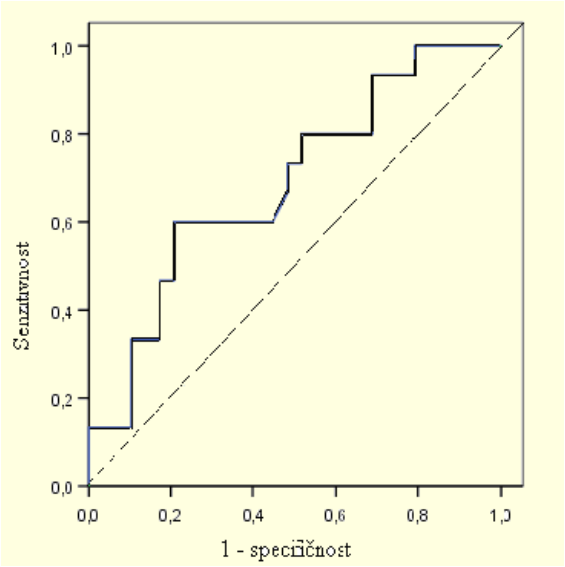
CTx: Diagnostično natančnost vrednosti parametra CTx smo določili s pomočjo površine pod ROC krivuljo – AUC=0,846 (95% IZ: 0,675-1,018; p=0,005). Pri razmejitveni točki 0,165 ng/mL je senzitivnost 80% in specifičnost 85,7%; pri razmejitveni točki 0,149 ng/mL pa je senzitivnost 90% in specifičnost 78,6%.



Grafikon 4: ROC krivulja za biokemični parameter CTx pri zimski skupini

Poletna in zimska skupina:

bALP: Diagnostično natančnost vrednosti parametra bALP smo določili s pomočjo površine pod ROC krivuljo – AUC=0,686 (95% IZ: 0,521-0,852; p=0,045). Pri razmejitveni točki (cut-off point) 13,85 U/L je senzitivnost 73,3% in specifičnost 51,7%.



Grafikon 5: ROC krivulja za biokemični parameter bALP pri zimski in poletni skupini skupaj

CTx: Za ta parameter ne moremo potrditi diagnostične vrednosti pri napovedovanju poporodne pareze oz. nizke vsebnosti Ca v krvi krav.

4. <u>Logistična regresija:</u>

Variablo CTx smo pri poletni in zimski skupini skupaj kategorizirali v dva razreda: ≥0,121 ng/mL in <0,121 ng/mL. Takšno – dihotomno – smo jo dali v model univariatne logistične regresije.

Logistična regresija pokaže, da sta CTx pri drugem odvzemu in Ca pri tretjem odvzemu statistično značilno povezana ($\chi 2$=4,18, p=0,041). Obeti za razvoj poporodne pareze so pri kravah, ki imajo CTx ob drugem odvzemu ≥0,121 ng/mL kar 3,8 krat večji kot pri kravah z nižjim CTx (95% IZ za razmerje obetov: 1,02-14,21).

4.5 VPLIV ESTRADIOLA NA VREDNOSTI Ca, aP, bALP in CTx PRI POSAMEZNIH ODVZEMIH ZA POLETNO IN ZIMSKO SKUPINO KRAV SKUPAJ

Zahtevi po normalnosti porazdelitve podatkov izbranih izmerjenih parametrov ni zadoščeno, zato smo uporabili neparametrično metodo in interpretiramo Kendallov korelacijski koeficient. Pri prvem odvzemu nismo mogli potrditi statistično značilne povezanosti med estradiolom in Ca, aP, bALP ter CTx. Estradiol je statistično značilno negativno povezan s Ca (τ=- 0,34, $p<0,01$) in pozitivno z bALP (τ=0,23, $p<0,05$) pri drugem odvzemu. Med estradiolom in izbranimi parametri ni statistično značilne povezanosti pri tretjem odvzemu. Ob četrtem odvzemu je bila ugotovljena statistično značilna negativna povezanost med estradiolom in Ca (τ=-0,28, $p<0,05$). Nakazala se je tudi pozitivna povezanost s CTx (τ=0,20, $p=0,066$), pri ostalih parametrih nismo ugotovili nikakršnih povezav.

4.6 VPLIV KLIMATSKIH RAZMER V ČASU ODVZEMA VZORCEV NA DOBLJENE VREDNOSTI BIOKEMIJSKIH PARAMETROV

Vrednosti klimatskih parametrov v času poletnega in zimskega obdobja so prikazane v tabelah 38 in 39.

Tabela 38: Povprečne vrednosti ± SD klimatskih parametrov v zimskem obdobju med posameznimi odvzemi

Odvzem v zimskem obdobju	Zračni tlak (hPa)	Vlažnost zraka (%)	Padavine (mm)	Povprečna dnevna T (°C)	Najnižja dnevna T (°C)	Najvišja dnevna T (°C)
1	986,8 ± 3,3	89,6 ± 7,8	5,2 ± 7,0	4,1 ± 2,3	1,5 ± 3,1	7,5 ± 2,6
2	986,8 ± 9,6	81,7 ± 7,5	1,9 ± 5,1	2,8 ± 3,6	-1,4 ± 4,3	8,7 ± 4,6
3	986,1 ± 8,3	85,1 ± 7,7	4,5 ± 12,0	2,1 ± 3,4	-2,0 ± 3,0	8,5 ± 5,2
4	980,4 ± 8,9	87,9 ± 7,6	8,7 ± 15,6	4,5 ± 3,1	1,3 ± 3,1	9,4 ± 4,5

Tabela 39: Povprečne vrednosti ± SD klimatskih parametrov v poletnem obdobju med posameznimi odvzemi

Odvzem v poletnem obdobju	Zračni tlak (hPa)	Vlažnost zraka (%)	Padavine (mm)	Povprečna dnevna T (°C)	Najnižja dnevna T (°C)	Najvišja dnevna T (°C)
1	979,8 ± 2,8	64,5 ± 6,2	0,8 ± 1,7	18,5 ± 4,1	11,7 ± 4,3	26,3 ± 4,6
2	978,1 ± 4,3	70,9 ± 8,5	1,6 ± 2,1	19,0 ± 2,4	12,4 ± 2,2	27,1 ± 3,3
3	979,2 ± 5,6	75,3 ± 9,3	2,6 ± 3,5	17,6 ± 2,6	11,8 ± 2,7	24,7 ± 4,4
4	979,1 ± 3,6	73,4 ± 8,7	2,8 ± 3,4	18,8 ± 3,3	12,7 ± 2,8	26,0 ± 4,6

Zaradi nenormalnosti porazdelitve vzorčnih vrednosti smo izračunali korelacije z biokemijskimi parametri z neparametrično metodo (Kendall-ov korelacijski koeficient). Povezanost med klimatskimi dejavniki in Ca, bALP in CTx je bila ugotovljena pri posameznih odvzemih v poletnem in zimskem obdobju.

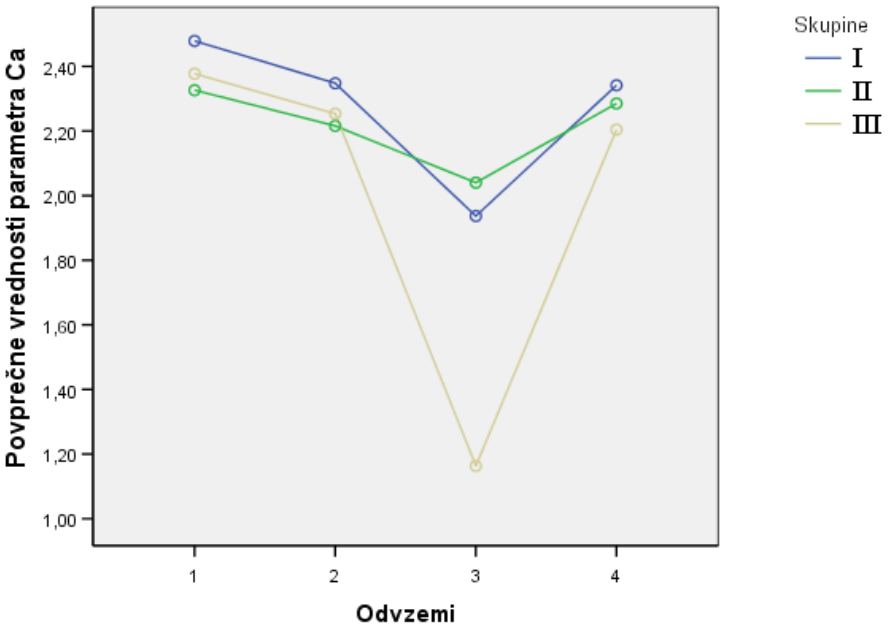
V zimskem obdobju smo ugotovili statistično značilno povezanost med bALP in najnižjo dnevno T (τ=0,386, p=0,047) ter med CTx in povprečnim dnevnim tlakom (τ=-0,510, p=0,009), povprečno dnevno T (τ=0,425, p=0,029) ter najnižjo dnevno T (τ=0,490, p=0,011) pri drugem odvzemu. Statistično značilna povezanost je bila ugotovljena še med Ca in povprečno dnevno T (τ=-0,480, p=0,016) ter najvišjo dnevno T (τ=-0,420, p=0,035), med bALP in najvišjo dnevno T (τ=0,400, p=0,041) ter med CTx in povprečno dnevno T (τ=0,498, p=0,011), najnižjo dnevno T (τ=0,459, p=0,019) in najvišjo dnevno T (τ=0,517, p=0,008) pri četrtem odvzemu. Pri prvem in tretjem odvzemu nismo ugotovili statistično značilnih povezav.

V poletnem obdobju smo ugotovili statistično značilno povezanost pri drugem odvzemu med Ca in povprečno T (τ=-0,342, p=0,036) ter najvišjo dnevno T (τ=-0,401, p=0,015) in med bALP in povprečno vlago (τ=-0,405, p=0,013) ter najvišjo dnevno T (τ=0,322, p=0,048). Pri tretjem odvzemu smo ugotovili korelacijo med povprečnim dnevnim tlakom in Ca (τ=-0,466, p=0,004), bALP (τ=-0,318, p=0,048) ter CTx (τ=-0,385, p=0,017). Pri prvem in četrtem odvzemu v poletnem obdobju nismo ugotovili statistično značilne povezanosti med Ca, bALP in CTx ter klimatskimi parametri.

5 DISKUSIJA

5.1 KONCENTRACIJA SERUMSKEGA KALCIJA

V opravljeni raziskavi smo ugotovili statistično značilen vpliv fiziološkega obdobja (odvzema) in skupine na izmerjene vrednosti Ca. Gibanje vrednosti Ca po fizioloških obdobjih v skupinah krav v poletnem in zimskem času ter pri kravah, ki so obolele za obporodno hipokalcemično parezo, je prikazano v grafikonu 6.



Grafikon 6: Gibanje koncentracije povprečnih vrednosti celokupnega serumskega Ca (mmol/L) pri molznicah v štirih fizioloških obdobjih (odvzemi) v poletnem (I) in zimskem (II) času ter pri tistih s PH (III)

Pri vseh treh skupinah krav smo izmerili najvišje koncentracije celokupnega serumskega Ca približno 1 mesec pred telitvijo (tabeli 12 in 14). V tem času so potrebe po Ca zelo nizke, le za vzdrževanje in dodatno še okoli 10 g Ca na dan mora dobiti plod (Horst in sod., 2005). Ker je koncentracija Ca v krvi visoka se lahko tudi shranjuje v okostje in tako obnavlja rezerve, ki so se porabile v času intenzivne prireje mleka. Mnenja smo, da ima nižanje vsebnosti Ca v krmi v tem obdobju potencialno negativen učinek na uspešno obnovo rezerv Ca v okostju.

Posledica tega je lahko zelo hudo izčrpanje krave v prihajajoči laktaciji in močna osteoporoza ter oslabitev okostja krave. Pri miših ugotavljajo kar od 5 do 10 % povečanje vsebnosti mineralov v okostju v času gravidnosti z metodo dual X-ray absorbtiometry (DXA), kar kaže na to, da je kostno tkivo bolj v anaboličnem kot kataboličnem stanju (Kovacs, 2005). Kopičenje rezerv Ca in drugih mineralov v času presušitve kot zaščita pred izrazitejšo demineralizacijo v času laktacije velja verjetno tudi za govedo, ki se srečuje z izrazitim povečanjem potreb po Ca za potrebe laktacije.

Ob drugem odvzemu, ko se že bliža porod, pri vseh treh skupinah krav že beležimo statistično značilno znižanje vsebnosti Ca v krvi, ki pa je pri vseh treh skupinah enako. Povprečna vsebnost Ca v krvnem serumu je tu v naši raziskavi že blizu spodnje fiziološke meje (2,25 mmol/L) za govedo (Jazbec, 1999). V tem času se že sintetizira kolostrum v mlečni žlezi. Kolostrum predstavlja pomembnega novega porabnika Ca, saj vsebuje na liter kar okoli 2 g Ca (Goff, 2000). Primeri, ko krave obležijo zaradi hipokalcemične obporodne pareze že pred telitvijo, niso tako redki (Smith, 2002).

Najnižje koncentracije serumskega Ca smo izmerili pri kravah znotraj 48 ur po telitvi. Vrednosti v tem fiziološkem obdobju so nižje kot v ostalih fizioloških obdobjih. Podobno so ugotovili številni raziskovalci (Ramberg in sod, 1984; Lappeteläinen in sod., 1993, Bigras-Poulin in Tremblay, 1998, Gašperlin, 2000b; Larsen in sod., 2001). Neposredno pred porodom in po porodu se lahko po mnenju nekaterih raziskovalcev koncentracija Ca v krvnem serumu fiziološko zniža do 1,75 mmol/L (Reinhardt in sod., 1988; Goff in Horst, 1993; Horst in sod., 1994). To je povezano z začetkom laktacije, ki povzroči nagel porast potreb po Ca. Ker homeostatski mehanizmi še niso adaptirani na tako skokovito povečanje potreb po Ca, jih organizem le s težavo zadovoljuje. Posledica tega je znižanje koncentracija serumskega Ca pod fiziološko mejo.

Krave s klinično zaznavno PH imajo koncentracijo celokupnega serumskega Ca pod 1,75 mmol/L (Gregorović, 1992; Klinkon in sod., 1994), po nekaterih avtorjih pa že pod 1,87 mmol/L (Carlstrom, 1970; Oetzel, 1988). Določene krave v naši študiji so imele koncentracijo celokupnega serumskega Ca pod to mejo, vendar niso kazale znamenj PH. To kaže, da merjenje celokupnega serumskega Ca nima 100% specifičnosti pri diagnostiki PH. Podobno sta ugotovila tudi Bigras-Poulin in Tremblay (1998), ko sta merila celokupni serumski Ca pri 1021 HF molznicah vseh starosti v poporodnem obdobju. Goff (2000b) razlaga omenjeno dejstvo s kislinsko baznim ravnotežjem krvi, ki vpliva na vezavo Ca ionov na albumine krvi in jih tako naredi nedostopne za tkiva v primeru, da je organizem bolj v alkalotičnem stanju, oz. zmanjša vezavo Ca ionov v primeru acidotičnega stanja.

Poporodna hipokalcemija je vsaj delno tudi posledica procesa staranja in bi jo bilo mogoče smiselno pri posamezni kravi po porodu ocenjevati v luči njene starosti. S starostjo živali se zmanjšuje število receptorjev v ciljnih celicah, tako za PTH kot tudi za kalcitriol (Horst in sod., 1990). Mlade živali (prvesnice) zato skoraj nikoli ne zbolijo za hipokalcemično parezo. Po izračunu DeGarisa in Leana (2008) se verjetnost hipokalcemične obporodne pareze z vsako laktacijo poveča za 9%.

V naši študiji je bila koncentracija serumskega Ca v skupini krav s poporodno parezo v povprečju 1,16 ± 0,32 mmol/L, kar je statistično značilno nižje kot pri drugih kravah v istem fiziološkem obdobju, v zimski in poletni skupini ($p<0,001$). Pri kravah s poporodno parezo smo ugotovili statistično značilno večje znižanje Ca od 2. do 3. odvzema kot pri poletni in zimski skupini krav. Živali s poporodno parezo, ki so obležale, so se ugodno odzvale na terapijo s Ca in P preparati za parenteralno aplikacijo. Druge vrste terapije niso potrebovale, kar potrjuje točnost diagnoze in odsotnost vzporednih bolezni, ki lahko povzročijo, da krave obležijo po telitvi.

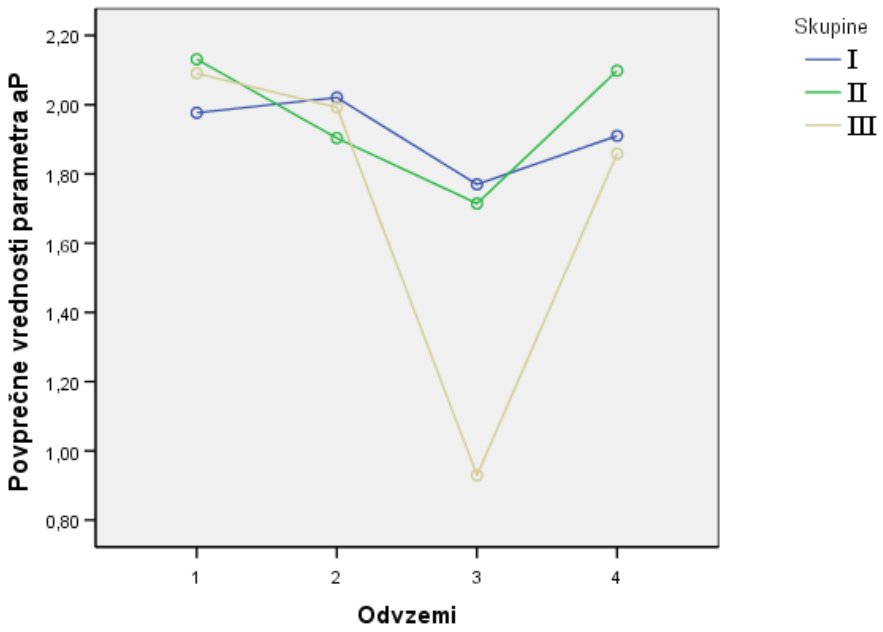
Kasneje se je koncentracija Ca od 3. odvzema do 4. odvzema statistično značilno bolj povečala pri skupini krav s poporodno parezo kot pri poletni in zimski skupini zdravih krav. To je razumljivo, saj bi ob enakem povečanju, kot je bilo pri zdravih kravah, bile te še vedno izrazito hipokalcemične in zaradi tega prizadete. V povprečju pa je bila pri njih koncentracija celokupnega serumskega Ca še vedno rahlo pod spodnjo normalno vrednostjo za odraslo govedo, 2,24 mmol/L (Jazbec, 1999). V vseh treh skupinah krav 10 do 20 dni PP so bile koncentracije serumskega Ca statistično značilno višje kot v obdobju do 48 ur PP ($p<0,05$). S časom se oskrba s Ca stabilizira na račun adaptacije na intenzivnejšo aktivno absorpcijo Ca iz črevesa in resorpcijo iz zalog, naloženih v okostju. Minimalna nihanja koncentracije celokupnega serumskega Ca po fizioloških obdobjih krav (razen ožjega obporodnega) so rezultat zanesljive hormonske regulacije, ki lahko odpove le v najbolj ekstremnih okoliščinah (Goff, 2000). Letni čas v naši raziskavi ni imel statistično značilnega vpliva na vrednost Ca. Tudi v nam dostopni literaturi nismo zasledili podatka, da bi letni čas statistično značilno vplival na vrednosti celokupnega serumskega Ca pri govedu v obporodnem obdobju. Optimalna vsebnost Ca v krvi kravam tudi dopusti doseg viška laktacije, saj je le tako omogočeno normalno delovanje organizma in z njim povezana maksimalna prireja mleka.

5.2 pH VREDNOSTI URINA

Merjenje pH vrednosti urina pri kravah v ožjem predporodnem obdobju je enostavna, praktična metoda spremljanja učinkovitosti dodajanja anionskih soli obroku z namenom povzročitve kompenzirane metabolične acidoze organizma, ki je dokazano učinkovita za preprečevanje PH (Lean in sod., 2006). Količina anionskih soli v obroku bo učinkovito preprečevala nastanek PH, če bo pH vrednost urina med 6,2 in 6,8 (Oetzel, 2000). Fiziološka pH vrednost urina goveda je nad 7,4 (Smith, 2002). Pri vseh kravah smo s testnimi lističi za ugotavljanje pH izmerili pH urina med 8 in 9, kar potrjuje le, da je pH v mejah fiziološke vrednosti za govedo, ki je zdravo, na obroku s prebitkom kationov in ni dobilo anionskih soli. Obrok, ki so ga dobivale krave pred telitvijo v našem poskusu, je imel DCAD okoli +300 mEq/kg SS, kar potrjuje prebitek kationov, predvsem K^+ in Na^+, v njem in zelo pomemben dejavnik tveganja za nastanek PH. Prebitek kationov v obroku za molznice v ožjem predporodnem obdobju je verjetno tudi glavni vzrok za zelo visoko incidenco PH pri kravah v našem poskusu, saj je od vseh 56 krav vključenih v poskus zbolelo za PH kar 14 krav oz. 25%. Številni avtorji poročajo, da je DCAD v mejah, kot smo ga imeli v našem poskusu, povzročal primerljivo incidenco PH (Gaynor, 1989; Goff, 1992; Lean in sod., 2006; Oetzel, 2000).

5.3 KONCENTRACIJA SERUMSKEGA ANORGANSKEGA FOSFATA

V opravljeni raziskavi smo ugotovili statistično značilen vpliv ($p<0,05$) fiziološkega obdobja (odvzema) in skupine na izmerjene serumske vrednosti aP. Gibanje vrednosti aP po fizioloških obdobjih v skupinah krav v poletnem in zimskem času ter pri kravah, ki so obolele za obporodno hipokalcemično parezo, je ponazorjeno v grafikonu 7 in tabelah 12 in 17.



Grafikon 7: Gibanje koncentracije povprečnih vrednosti serumskega aP (mmol/L) pri molznicah v štirih fizioloških obdobjih (odvzemi) v poletnem (I) in zimskem (II) času ter pri tistih s PH (III)

Najvišje povprečne vrednosti aP smo izmerili pri kravah v zimski skupini ob 1. in 4. Odvzemu (tabela 12). Pri kravah, ki so obolele za poporodno parezo, smo najvišje vrednosti izmerili prav tako ob prvem odvzemu (2,09±0,30 mmol/L), vendar niso bile statistično značilno višje kot pri drugem odvzemu. Najvišje vrednosti ob prvem odvzemu razlagamo z relativno nizkimi potrebami po fosforju v tem času, ki jih krava brez težav zagotovi tudi z manj koncentriranim obrokom (NRC, 2001) in hkratni primerni oskrbljenosti s Ca, kar pomeni, da se homeostatski mehanizmi za ohranjanje normokalcemije, ki vplivajo tudi na koncentracijo aP, niso aktivirali (Goff, 2000). Pri zimski skupini in skupini krav z obporodno parezo se je vsebnost do telitve, ko je bila najnižja med vsemi odvzemi, zniževala. Gibanje je bilo nekoliko drugačno pri skupini krav v poletnem režimu reje, saj pri njih beležimo najvišjo povprečno vsebnost aP (2,02±0,34 mmol/L) ob 2. odvzemu, ki mu sledi najnižja vrednost ob telitvi. Vendar pa v poletni skupini nismo ugotovili statistično značilnih razlik med štirimi odvzemi. V zimski skupini smo ugotovili statistično značilno višjo vrednost aP pri odvzemu 4 glede na odvzem 3 ($p<0,05$). To si razlagamo s prehodom na energetsko bogat obrok po telitvi, v katerem je tudi zadosti fosforja ter izboljšanjem konzumacije krme v času okoli 3

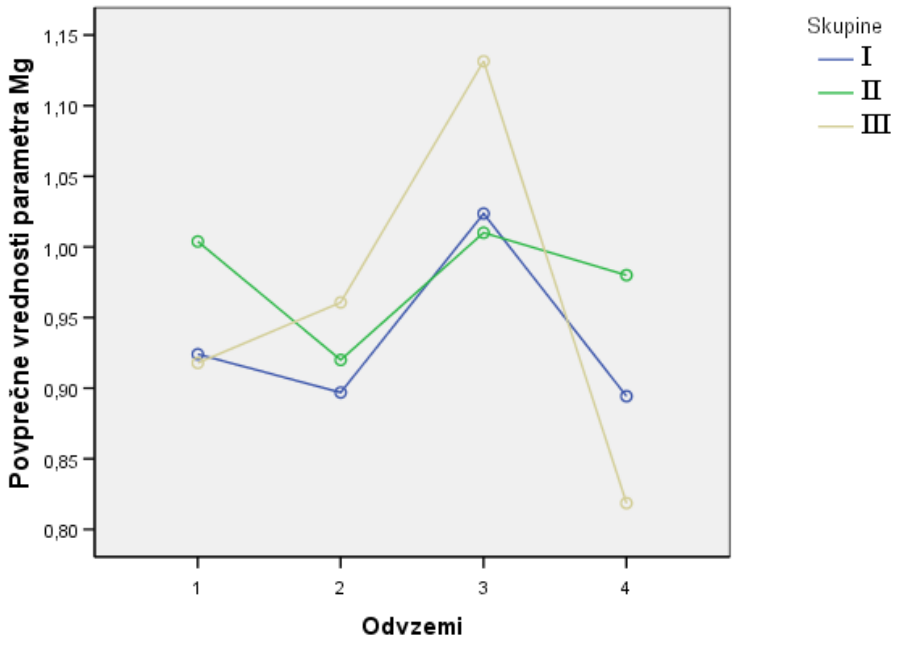
tedne po telitvi, ki je povezana tudi z boljšo oskrbo. V prvih 48 urah PP, ko se statistično značilno zniža koncentracija serumskega Ca, pride tudi do statistično značilnega znižanja koncentracije serumskega aP glede na ostala fiziološka obdobja pri vseh skupinah krav v naši študiji ter tudi v drugih študijah (Goff in sod., 1986; Reinhardt in sod., 1988; Bigras-Poulin in Tremblay, 1998). Znižanje serumske koncentracije aP je posledica učinkov PTH, katerega primarna naloga je dvig nivoja serumskega Ca, povzroča pa tudi večje izločanje aP skozi ledvice (fosfaturičen učinek) in slinske žleze (Goff, 2000).

Krave s poporodno parezo so bile za razliko od zdravih izrazito hipofosfatemične, aP = 0,93 ± 0,43 mmol/L. Pri kravah s poporodno parezo je bilo znižanje aP od 2. do 3. in po tem zvišanje od 3. do 4. odvzema statistično značilno večje kot pri poletni in zimski skupini. Tudi v tem primeru večje povišanje razlagamo s parenteralno aplikacijo P preparatov in vplivom homeostatkih mehanizmov, ki primarno zvišujejo koncentracijo Ca, imajo pa tudi pozitiven vpliv na koncentracijo aP v krvi. Kot primer lahko navedemo resorpcijo mineralizirane kostnine, pri kateri se pri mobilizaciji hidroksiapatita ob 10 ionih Ca sprosti v obtok tudi 6 ionov aP (Goff, 2000).

Letni čas ni imel vpliva na nihanje povprečnih vrednosti aP v naši raziskavi.

5.4 KONCENTRACIJA SERUMSKEGA MAGNEZIJA

V opravljeni raziskavi smo ugotovili statistično značilen vpliv fiziološkega obdobja (odvzema) in skupine na izmerjene vrednosti Mg. Gibanje povprečnih vrednosti Mg po fizioloških obdobjih v skupinah krav v poletnem in zimskem času ter pri kravah, ki so obolele za obporodno hipokalcemično parezo, je ponazorjeno v grafikonu 8 ter tabelah 12 in 20.



Grafikon 8: Gibanje koncentracije povprečnih vrednosti serumskega Mg (mmol/L) pri molznicah v štirih fizioloških obdobjih (odvzemi) v poletnem (I) in zimskem (II) času ter pri tistih s PH (III)

Iz dobljenih rezultatov lahko razberemo, da se je pri vseh treh skupinah krav serumska koncentracija Mg gibala enako (statistično značilnih razlik med skupinami ni bilo). Kar pomeni, da niti letni čas niti poporodna pareza nista imel vpliva na vrednosti Mg v naši raziskavi.

Lappeteläinen in sod. (1993) tudi ne ugotavljajo statistično značilnih razlik med koncentracijo Mg pri kravah s parezo in zdravih po telitvi ter pri negravidnih kravah.

Zanimivo je, da je prišlo pri zdravih kravah v poletni in zimski skupini pri odvzemu tik pred telitvijo do znižanja vsebnosti Mg v krvnem serumu, za razliko od tistih, ki so obolele, kjer se je povišala, vendar pa kontrast med 1. in 2. odvzemom pri nobeni od skupin ni bil statistično značilne ($p>0,05$). Zgleda, da so tu potrebe po Mg za rast ploda, sintezo kolostruma in intenzivnejšo izgradnjo kostnine že tako visoke, da ima negativen vpliv na serumsko koncentracijo Mg, saj je bila v tem času tudi koncentracija celokupnega serumskega Ca že nekoliko nižja. To kaže na pomembnost dodajanja Mg presušenim kravam, še posebej v pozni presušitvi, kar je tudi eno od osnovnih priporočil za preprečevanje obporodne pareze (Goff, 2000). Van de Braak in sod. (1987b) v svojem poskusu na kravah v obporodnem obdobju, ki so bile krmljene z obrokom z visoko vsebnostjo Mg, in tistimi, ki so dobivale premalo Mg v

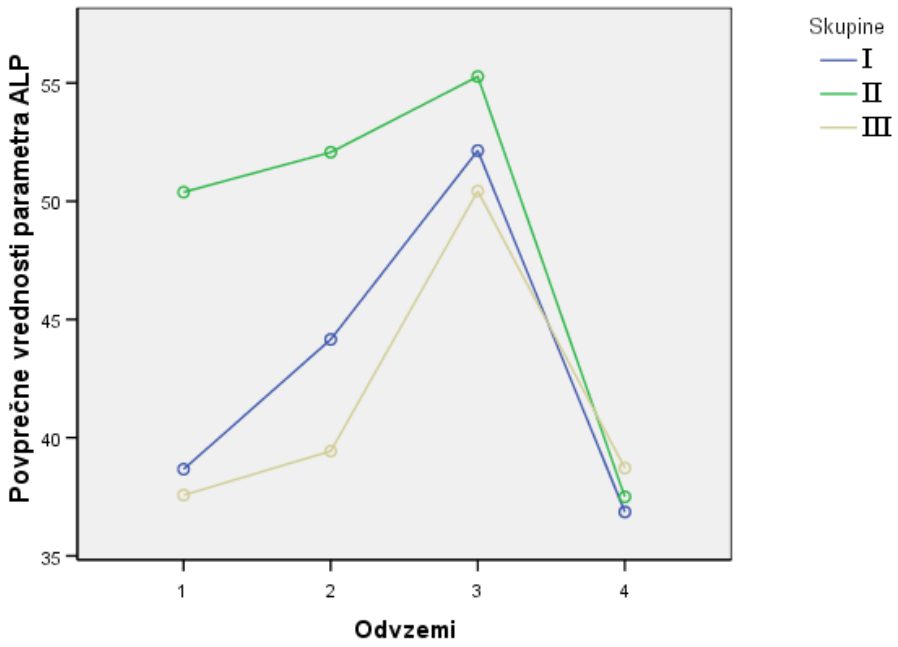
obroku pred telitvijo, dokazuje, da je mobilizacija Ca po telitvi višja, če so krave dobro oskrbljene z Mg. Po telitvi ni tudi nobena krava iz skupine z dobro oskrbljenostjo z Mg kazala znakov PH, med tem ko sta dve oboleli v skupini, ki je dobivala premalo Mg v obroku pred telitvijo.

Med odvzemi se je statistično značilna razlika ($p<0,05$) pokazala v poletni skupini pri drugem kontrastu, ko se je koncentracija Mg pri 3. odvzemu povišala glede na 2. odvzem in pri 3. kontrastu, ko se je glede na 3. odvzem v 4. znižala. V zimski skupini krav te razlike niso bile statistično značilne, se je pa koncentracija gibala po enakem vzorcu. To si lahko razlagamo s slabšo oskrbljenostjo krav z Mg v poletnem času, ko dobivajo del obroka s pašo. Zato tu beležimo pri 1., 2. in 4. odvzemu nižjo vrednost Mg kot v zimski skupini.

Ugotovili smo statistično značilno interakcijo med odvzemom in skupino za tretji kontrast, med odvzemom 3 in 4 ($p<0,01$), kjer lahko iz grafikona razberemo, da je bilo znižanje serumske koncentracije Mg pri skupini krav s poporodno parezo večje kot pri drugih dveh skupinah. To govori tudi v prid teoriji, da je serumska koncentracija Mg zelo pomemben dejavnik nastanka poporodne pareze (Goff, 2008). Krave, ki so obolele za poporodno parezo, so imele približno 1 mesec pred telitvijo najnižje vrednosti Mg. Ob nastopu poporodne pareze se je sicer koncentracija Mg navidezno močno povišala, statistično značilno glede na 1., 2. in 4. odvzem. Podobno negativno povezanost med Ca in Mg v ožjem poporodnem obdobju ugotavljajo Riond in sod. (1995) ter Larsen in sod. (2001). Povzročal naj bi jo PTH, ki stimulira tubularno resorpcijo Mg v ledvicah pri kravah s poporodno hipokalcemijo (Oetzel, 1988; Fontenot in sod., 1989). Drugi dejavnik pa naj bi bilo vzdrževanje ionskega ravnotežja in posledično verjetno večji prehod intraceličnega Mg v krvni obtok (Smith, 2002). Torej je povišanje koncentracije Mg v času hipokalcemije v bistvu le navidezno, saj je ob normalizaciji hipokalcemične pareze prišlo hitro do zelo izrazitega znižanja koncentracije serumskega Mg. Tudi pri zdravih kravah v poletnem in zimskem obdobju ugotavljamo enak fenomen, vendar manj izrazit. Podobno so ugotovili tudi Kronfeld (1971), Gašperlin (2000b) in Larsen in sod. (2001). Verjetno je to tudi obrambni mehanizem proti obporodni hipokalcemiji, ker je Mg zelo pomemben za učinek PTH v ciljnih tkivih. Receptorji za PTH v ciljnih tkivih sprožajo nastajanje t.i. second massanger-ja s pomočjo adenilat ckiklaze in fosfolipaze C, ki pa obe potrebujeta za normalno delovanje Mg. Zato je zelo pomembno, da je v obroku za krave v pozni presušitvi vsaj 0,35 do 0,4% Mg, drugače lahko že samo pomanjkanje Mg sproža tudi hipokalcemijo (Goff, 2000).

5.5 AKTIVNOST CELOKUPNE SERUMSKE ALKALNE FOSFATAZE

Ugotovili smo statistično značilen učinek odvzema na gibanje aktivnosti celokupne serumske ALP. Učinek skupine pa je bil statistično nesignifikanten (p>0,05), kar pomeni, da so se v vseh treh skupinah vrednosti enako spreminjale in med njimi ni bilo značilnih razlik. Gibanje parametra ALP je prikazano v grafikonu 9 ter tabelah 12 in 23.



Grafikon 9: Gibanje povprečnih vrednosti aktivnosti celokupne serumske ALP (U/L) pri molznicah v štirih fizioloških obdobjih (odvzemi) v poletnem (I) in zimskem (II) času ter pri tistih s PH (III)

Najvišje vrednosti ALP smo ugotovili v ožjem poporodnem obdobju, kar se ujema z ugotovitvami Sato in sod. (2005), ki so merili ALP pri kravah med presušitvijo, zgodnjo, vrhom, srednjo in pozno laktacijo. Vrednosti pri kravah, ki so obolele za poporodno parezo so primerljive s tistimi, ki so jih ugotovili tudi Klinkon in sod. (1994). Za vse krave, vključene v raziskavo, so bile vrednosti statistično značilno višje ob tretjem odvzemu kot ob 1., 2., in 4. Tudi vrednosti ob drugem odvzemu so bile statistično značilno višje kot ob 1. odvzemu. Predvidevamo, da je to posledica delovanja estrogena, ki ob porodu doseže najvišjo koncentracijo, po porodu pa se naglo zniža na bazalni nivo (Patel in sod., 1999). Estrogen učinkuje osteoprotektivno in anabolično na metabolizem kosti (Lovšin Barle, 2004). Najnižjo

vrednost ALP v ožjem poporodnem obdobju smo izmerili pri skupini krav s poporodno parezo, vendar ne statistično značilno. Enak rezultat so v raziskavi, kjer so primerjali aktivnost ALP in osteokalcina (biokemijskega kazalca izgrajevanja kostnine) med paretičnimi in zdravimi kravami po telitvi, dobili tudi Lappeteläinen in sod. (1993). Omenjeni avtorji sklepajo, da je metabolizem kostnega tkiva pri kravah s poporodno parezo na splošno manj aktiven kot pri zdravih kravah. Glede na to, da ALP dobro kolerira z bALP, pripisujemo zmanjšanje aktivnosti celokupne ALP predvsem zmanjšanju aktivnosti kostnega izoencima. Zato je celokupna ALP načeloma dober pokazatelj metabolizma kosti pri kravah molznicah pod pogojem, da izključujemo druga obolenja (npr. jeter), ki tudi lahko povišajo njeno aktivnost. ALP pri starejših živalih je pretežno jetrnega izvora (Allen, 2003). Krave v naši študiji so bile klinično zdrave, zato nihanja aktivnosti ALP pripisujemo pretežno nihanju kostnega izoencima, vendar pa znižanje bALP v naši študiji ni tako izrazito kot pri celokupni ALP. Zelo visoka aktivnost ALP takoj po porodu je lahko povezana tudi s placentnim izoencimom ALP. Mogoče je, da pri rahljanju stika med placento in endometrijem, pri čemer se celice tudi poškodujejo, nekaj ALP maternično in placentnega izvora prehaja tudi v krvni obtok krav (Peter in sod., 1987). Glede na relativno kratko razpolovno dobo ALP (nekaj dni), se je lahko do odvzema 4. že bistveno znižala.

Najnižje vrednosti celokupne ALP smo izmerili pri 1. in 4. odvzemu. Vzrok za nizke vrednosti ALP pri 1. odvzemu je lahko restriktiven obrok, ki zadošča le za vzdrževanje krave in rast ploda. Po telitvi pa pripisujemo znižanje celokupne ALP predvsem znižanju kostnega izoencima, ko se začne predvsem aktivna resorpcija kostnega tkiva za potrebe vzdrževanja normokalcemije, anabolična aktivnost kostnega tkiva pa je v tem obdobju minimalna in zato prihaja do neto izgubljanja kostne mase (Goff, 2004). Vrednosti v vseh treh skupinah krav so tu skoraj izenačene. Naše ugotovitve pri kravah v širšem poporodnem obdobju (4. skupina) se ne skladajo z ugotovitvami Sata in sod. (2005), ki so izmerili pri kravah v tem fiziološkem obdobju še zelo visoke vrednosti ALP. Visoko aktivnost ALP v tem obdobju pripisujejo predvsem laktaciji, pri čemer naj bi ALP, ki izvira iz parenhima mlečne žleze in je v visoki koncentraciji v mleku, prehajala tudi v krvni serum.

5.6 MERJENJE SPECIFIČNIH SERUMSKIH KAZALCEV METABOLIZMA KOSTI

Do sedaj so bili specifični kazalci metabolizma kosti uporabljeni le v nekaj nam dostopnih študijah na kravah, in to večinoma le v obporodnem obdobju (Chiappe in Capaul, 1985; Mosel in Corlett, 1990; Naito in sod., 1990; Lappeteläine in sod., 1993; Liesegang in sod., 1998; Liesegang in sod., 2000; Larsen in sod., 2001; Sato in sod., 2002; Ekelund, 2003; Iwama in sod., 2004; Holtenius in Ekelund, 2005; Sato in sod., 2005; Yamagishi in sod., 2005; Kurosaki in sod., 2007a; Filipović in sod., 2008; Starič in sod., 2008; Taylor in sod., 2008; Taylor in sod. 2009).

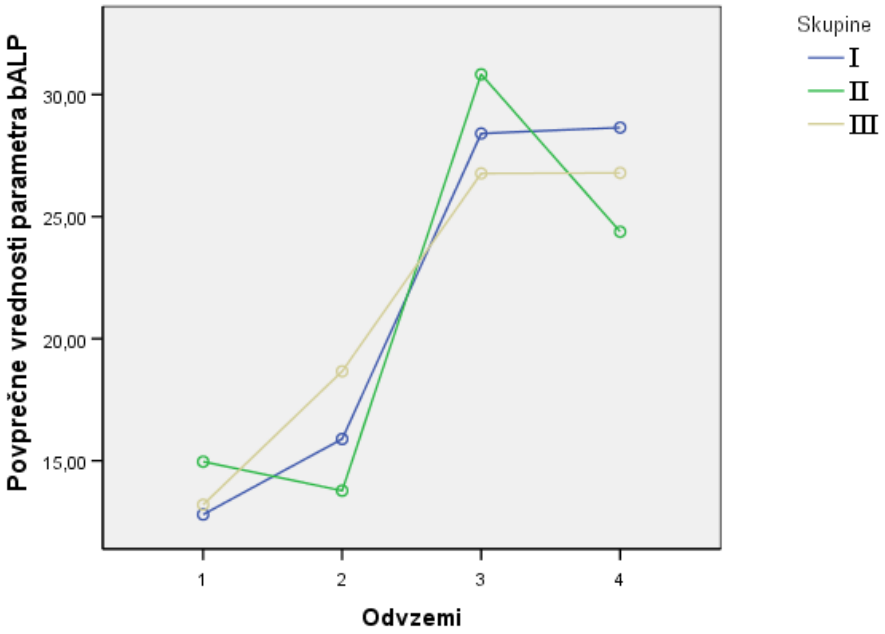
Pri interpretaciji kazalcev metabolizma kosti se moramo zavedati, da ne kažejo vsebnosti mineralov v kosteh, ampak samo na izgradnjo in resorpcijo kostnine. Ker naj bi bili pri preoblikovanju kostnine resorpcija in izgradnja kostnine med seboj v idealnih pogojih povezani in uravnoteženi, lahko odklon v kazalcev resorpcije kostnine ali izgrajevanja kostnine kaže na povečano izgradnjo ali razgradnjo kostnine (Christenson, 1997). Iz rezultatov naše študije lahko vidimo, da izgradnja in razgradnja kostnine v obdobju tranzicije nista uravnoteženi in povezani. To se sklada z ugotovitvami Liesegang in sod. (2000), ki pravijo, da sta resorpcija in sinteza kostnine nepovezani po telitvi in tudi Holteniusa in Ekelunda (2005), ki trdita, da sta nepovezani skozi laktacijo. Tudi Underwood in Suttle (1999) sta mnenja, da se med presušitvijo spongiozna kostnina intenzivneje izgrajuje, med laktacijo pa resorbira.

5.6.1 AKTIVNOST SERUMSKE KOSTNO SPECIFIČNE ALKALNE FOSFATAZE (bALP)

Za razliko od ALP, bALP proizvajajo le osteoblasti in je zato bolj specifičen kazalec metabolizma kosti od ALP. To je bil razlog, da smo jo vključili v študijo. Sklepamo tudi, da pri našem testu za ugotavljanje bALP ne prihaja do lažnega povišanja tega encima na račun ALP, ki izvira iz mlečne žleze in lahko prehaja tudi v krvni serum, o čemer so poročali Sato in sod. (2002) pri Rosalkijevi metodi določanja tega izoencima, saj naš test temelji na imunološkem določanju. Aktivnost bALP največ uporabljajo kot pripomoček pri študijah o osteoporozi pri ženskah po menopavzi in pri ocenjevanju nastajanja kostnine pri drugih

bolnikih (npr. tumorozna obolenja okostja). Tudi pri živalih se je bALP pokazal kot zelo dober kazalec izgrajevanja kostnine oz. anabolične aktivnosti okostja (Allen, 2003).

Aktivnost serumske bALP v naši študiji ima podoben vzorec gibanja kot aktivnost celokupne serumske ALP. Ugotovljen je bil statistično značilen učinek odvzema na gibanje aktivnosti celokupne serumske bALP. Učinek skupine je bil kot pri celokupni ALP statistično nesignifikanten, kar pomeni, da so se v vseh treh skupinah vrednosti enako spreminjale in med njimi ni bilo značilnih razlik. Gibanje aktivnosti bALP je prikazano v grafikonu 10 ter tabelah 12 in 26.



Grafikon 10: Gibanje povprečnih vrednosti aktivnosti serumske bALP (U/L) pri molznicah v štirih fizioloških obdobjih (odvzemi) v poletnem (I) in zimskem (II) času ter pri tistih s PH (III)

Najvišjo aktivnost smo izmerili pri 3. in 4. odvzemu (poporodno obdobje). V času presušenosti so bile vrednosti bALP statistično značilno nižje pri vseh skupinah. Zanimivo je, da se je v zimski skupini pri 4. odvzemu znižala glede na 3. odvzem, vendar ne na raven, kot je bila pred telitvijo. Pri poletni skupini in pri kravah s poporodno parezo pa se je rahlo povišala, vendar v vseh primerih te spremembe niso bile statistično značilne. Podobno so visoke vrednosti pri kravah po telitvi ugotovili tudi Sato in sod. (2005), vendar so to v veliki meri pripisovali ALP iz mlečne žleze. Visoke vrednosti bALP po telitvi so ugotovili tudi Kurosaki in sod. (2007a), ki so menja, da je bALP pomemben za aktivacijo metabolizma Ca po telitvi. Za razliko od nas pa so omenjeni raziskovalci ugotovili zniževanje bALP od poroda

pa do 7 dne po telitvi. Tudi rezultati Filipović in sod. (2008) se ne ujemajo z našimi, saj so imele krave molznice v njihovi študiji najvišje vrednosti bALP pred telitvijo, 10 in 30 dni po telitvi pa nekoliko nižje, vendar ne statistično značilno.

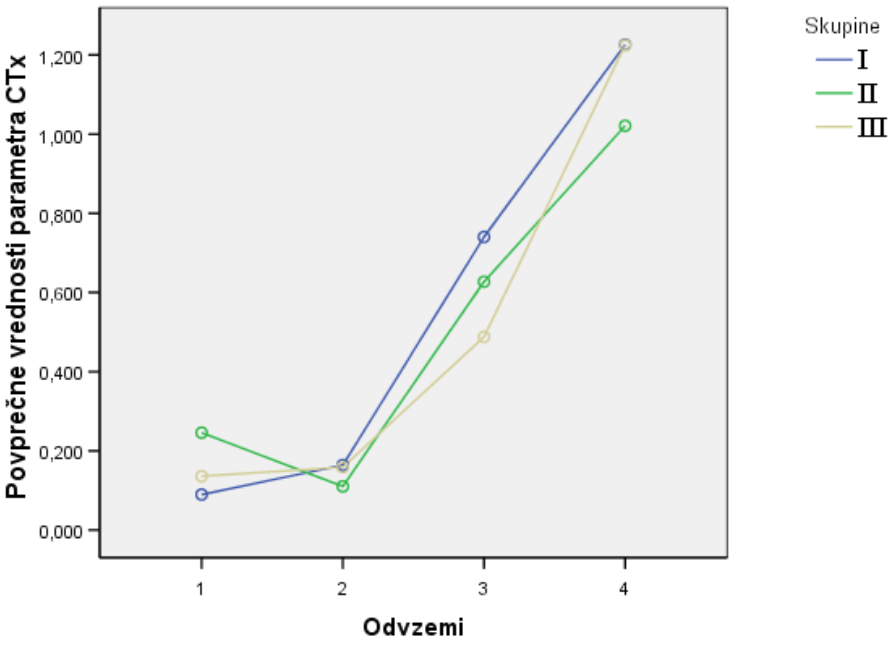
Aktivacija osteoblastne aktivnosti po telitvi je verjetno povezana z visoko koncentracijo hormona estrogena v obporodnem obdobju, ki deluje na kostnino anabolično. Receptorji za estrogen se namreč nahajajo v osteoblastih in hondroblastih in so nujni za normalno rast ter oblikovanje kosti (Lovšin Barle, 2004). Glede na to, da so v tem obdobju potrebe po Ca iz kosti največje, si težko drugače razlagamo največjo aktivnost izgrajevanja kostnine prav v tem obdobju. Liesegang in sod. (2000), Ekelund (2003), Iwama in sod. (2004) in Taylor in sod. (2009) pa so ugotovili okoli poroda najnižje vrednosti koncentracije OCN kot kazalca sinteze kostnine, kar je v nasprotju z našimi ugotovitvami. Kaže, da obstaja mehanizem, ki preprečuje sintezo OCN kot glavne Ca vežoče beljakovine v tem času, kljub temu da je anabolična aktivnost kosti visoka (visoka aktivnost bALP). Očitno se v tem času intenzivno sintetizirajo druge kostne beljakovine. Kurosaki in sod. (2007a) so ugotovili najvišjo aktivnost bALP po telitvi in hkrati izmeri najnižje vrednosti OCN v tem obdobju. Menijo, da bi to lahko bila posledica katalize OCN s placentnimi encimi, po izločitvi placente pa OCN začne zopet počasi naraščati. To se ujema z rezultati Holteniusa in Ekelunda (2005), ki ugotavljata naraščanje koncentracija OCN v krvni plazmi od poroda do sredine laktacije (ko so krave že breje), ko je dosegla neko raven, ki je obstala do pozne laktacije, kateri je sledilo postopno zniževanje do naslednje telitve. Podobno dinamiko OCN so ugotovili tudi Taylor in sod. (2009), le da je v skupini njihovih krav OCN dosegel najvišje vrednosti že okoli 35. dne laktacije. Velika aktivnost bALP po telitvi ima lahko funkcijo pri utrjevanju razrahlajnih porodnih poti.

Najnižje vrednosti bALP v ožjem poporodnem obdobju smo ugotovili pri kravah, ki so obolele za poporodno parezo, vendar razlika ni bila statistično značilna ($p>0,05$). Zgleda, da je pri njih metabolizem kostnega tkiva na splošno manj aktiven kot pri zdravih kravah v poletnem in zimskem obdobju. Podoben rezultat so pri merjenju OCN pri kravah s poporodno parezo in zdravih v ožjem poporodem obdobju dobili tudi Lappeteläine in sod. (1993) in Larsen in sod. (2001). Zanimivo je tudi, da je bila aktivnost bALP v ožjem predporodnem obdobju najvišja (vendar ne statistično značilno) pri kravah, ki so kasneje obolele za poporodno parezo. Pri kravah, ki so obolele, je bila tudi statistično značilno višja aktivnost bALP ob 2. odvzemu kot ob 1., kar ni veljalo za poletno in zimsko skupino. Zgleda, kot da bi se pri njih aktivacija kostnega metabolizma začela prezgodaj in zaradi tega ni dosegla ustrezne ravni.

Naše ugotovitve kažejo, da je aktivnost bALP dober kazalec kostnega metabolizma.

5.6.2 KONCENTRACIJA SERUMSKIH CTx

CTx je kazalec osteoklastne resorpcije kostnine. Največ se uporablja za spremljanje sprememb v zvezi z resorpcijo kostnine, kot pripomoček pri študijah pacientov z osteoporozo, pri ženskah po menopavzi, pa tudi pri ocenjevanju resorpcije kostnine pri drugih bolnikih (Christenson, 1997). Tudi pri govedu kaže na resorpcijo kostnine (Holtenius in Ekelund, 2005). Ugotovitve naše raziskave kažejo na statistično značilen vpliv fiziološkega obdobja (odvzema) in interakcije med odvzemom in skupino na izmerjene vrednosti CTx. Glede samo na dejavnik skupina pa se proti našemu pričakovanju vrednosti CTx niso statistično značilno razlikovale. Gibanje vrednosti CTx po fizioloških obdobjih v skupinah krav v poletnem in zimskem času ter pri kravah, ki so obolele za obporodno hipokalcemično parezo je ponazorjeno v grafikonu 11 ter tabelah 12 in 29.



Grafikon 11: Gibanje povprečnih vrednosti koncentracije serumskih CTx (ng/mL) pri molznicah v štirih fizioloških obdobjih (odvzemi) v poletnem (I) in zimskem (II) času ter pri tistih s PH (III)

Najnižje vrednosti CTx ugotavljamo pred telitvijo. V tem obdobju visoko breja krava dobi dovolj Ca za vzdrževanje in rast ploda ter kasneje za sintezo kolostruma s krmo, da ji ni potrebno črpati telesnih rezerv. Zanimivo je, da se je pri zimski skupini v primerjavi s poletno

in kravami s popoprodno parezo, vrednost CTx statistično značilno znižala od 1. do 2. odvzema, medtem ko se je pri drugih dveh skupinah zvišala. Menimo, da je to posledica dobre oskrbljenosti krav s Ca med ovimljanjem in verjetno tudi boljše konzumacije krme pri kravah v zimskem času kot v poletnem, ko so živali pod vplivom vročinskega stresa (Wheelock in sod., 2010). Izmerjene vrednosti CTx so statistično značilno nižje pred telitvijo kot po telitvi.

Zelo blizu statistične značilnosti (p=0,068) je tudi drugi kontrast, ko se je od drugega do tretjega odvzema koncentracija CTx pri kravah s parezo povišala manj kot pri zdravih kravah v poletni in zimski skupini. To kaže na manj izrazit odgovor kostnega tkiva na hipokalcemijo pri kravah s poporodno parezo glede na zdrave krave v poletnem in zimskem času. Očitno je pri njih moten odgovor kostnine na pomanjkanje Ca v krvi, ki bi moral spodbuditi resorpcijo kostnine in tako dvigniti koncentracijo celokupnega serumskega Ca. Menimo, da je vzrok temu tudi obrok, ki je bil izrazito kationski in je zato zaviral resorpcijo kostnine ter tako zabrisal bolj izrazito razliko med skupino s poporodno hipokalcemično parezo in zdravimi kravami (Lean in sod., 2006). Prevlado kationov v obroku je potrjevala tudi pH vrednost urina, ki se je gibal med 8,0 in 9,0. Kljub temu smo mnenja, da je resorpcija kostnega tkiva po telitvi pomemben dejavnik za ohranjanje normokalcemije, kar ni v soglasju z van de Braak in sod. (1987a), ki na osnovi histološke ocene resorpcije kostninega tkiva pri kravah med 3 in 8 urami PP ugotavljajo zelo nizko aktivnost, ki ji ne pripisujejo pomena za preprečevanje PH. Vzrok za to razhajanje je mogoče druga metodologija ugotavljanja, saj histologija kaže le trenutno stanje, kazalci kostnega metabolizma pa trenutno metabolično aktivnost tkiva. Pri prvesnicah pa tudi histološko ugotavljajo statistično pomembno katabolično aktivnost kostnega tkiva (van de Braak in sod.,1987a).

Pri vseh skupinah se je enako statistično značilno povišal CTx od 3. do 4. odvzema, kjer je dosegel tudi najvišjo vrednost v naši študiji. V tem času so tudi koncentracije serumskih estrogenov pri govedu najnižje (Patel in sod., 1999). Zato je tudi osteoprotektivno učinkovanje v tem obdobju nizko (Farhan in Sundeep, 2005). To potrjuje ugotovitve drugih, da se pri govedu kostnina intenzivno resorbira v zgodnjem poporodnem obdobju (Liesegang in sod., 2000; Filipović in sod., 2008).

Holtenius in Ekelund (2005) sta ugotovila najvišjo koncentracijo CTx en teden po porodu pri spremljanju 11 pluriparih molznic med laktacijo in presušitvijo, kar se načelno sklada z našimi ugotovitvami. Filipović in sod. (2008) pa so izmerili statistično značilno višjo koncentracijo CTx pri kravah molznicah 30 dni po telitvi kot tudi 10 dni po telitvi, kar se sklada z našimi ugotovitvami. Tudi Liesegang in sod. (2000) ugotavljajo najvišje vrednosti

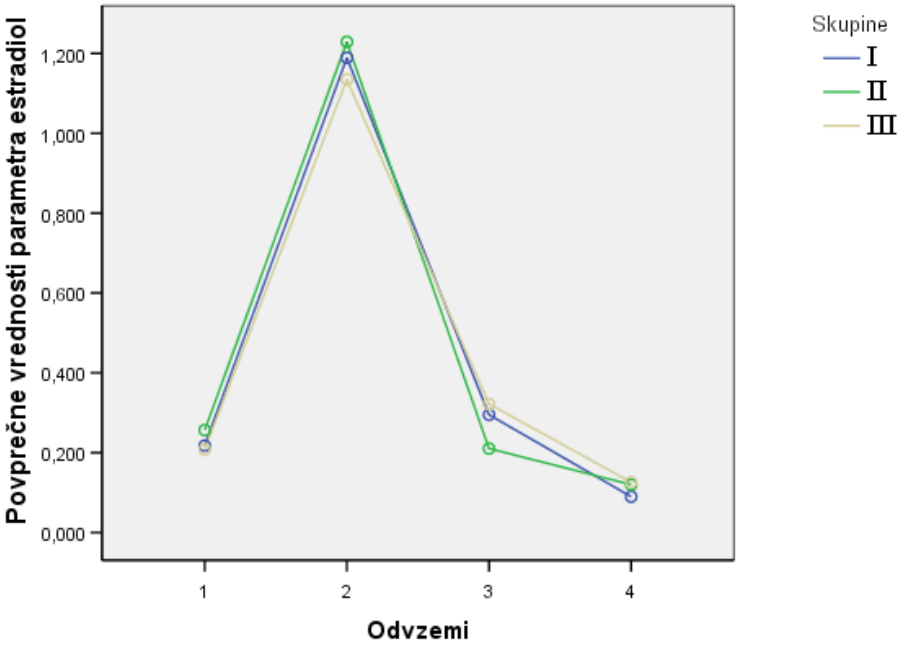
piridinolina, deoksipiridinolina in karboksiterminalnega telopeptida kolagena I (ICTP) pri vzorčenju 14 dni po telitvi, ko so spremljali metabolizem kostnega tkiva pri kravah od 14. dne pred telitvijo do 150. dne po telitvi. Podobno Kurosaki in sod. (2007a) ugotavljajo višanje tartrat rezistentne kisle fosfataze (TRAP), encima specifičnega za osteoklaste – indikator resorpcije kostnine, v času od telitve do 7 dni po telitvi. Ugotovitve Beighla (1999) pa so delno v nasprotju z našimi, saj ugotavlja z merjenjem koncentracije Ca v kortikalni kostnini, da je ta najnižja sredi laktacije ter sklepa, da se takrat najbolj resorbira. To si lahko razlagamo z dejstvom, da je spongiozna kostnina metabolično najaktivnejša in laže dostopna resorpciji kot kortikalna kostnina in tudi, da je kumulativni učinek resorpcije kortikalne kostnine v vsebnosti Ca opazen z zamikom, ko se jo dovolj razgradi, kar je verjetno šele sredi laktacije. Kazalci kostnega metabolizma pa ne kažejo na vsebnost mineralov v kosteh, ampak le aktivnost trenutnega metabolizma kosti.

Chiappe in Capaul (1985) poročata, da se plazemska koncentracija hidroksiprolina od 30 dni pred telitvijo do telitve več kot dvakrat podvoji, po telitvi pa nekoliko pade, kar je v nasprotju z našimi ugotovitvami glede koncentracije CTx. Pri kravah s poporodno parezo pa sta ugotovila signifikantno nižje koncentracije kot pri zdravih 1 do 3 dni po telitvi. Ugotovitev, da je pri kravah s poporodno parezo kostni metabolizem manj aktiven, se ujema z našo raziskavo.

Lappeteläinen in sod. (1993) so ugotovili nižje koncentracije hidroksiprolina pri paretičnih kravah kot pri neparetičnih, kar se tudi ujema z našimi ugotovitvami. Tudi oni sklepajo, da je pri kravah z obporodno parezo kostni metabolizem manj aktiven kot pri zdravih.

5.7 KONCENTRACIJA SERUMSKEGA 17β-ESTRADIOLA

Pri koncentraciji estradiola je bilo ugotovljeno precejšnje nihanje tega parametra pri 3. odvzemu med skupinami, zato se rezultate težko primerja med skupinami. Statistično značilno razliko smo ugotovili le glede na odvzem (fiziološko obdobje), glede na interakcijo med odvzemom in skupino ter glede na skupino statistično značilnih razlik v vrednosti estradiola nismo ugotovili. To pomeni, da se je koncentracija estradiola pri vseh treh skupinah krav enako spreminjala in med njimi pri povprečni vrednosti estradiola ne obstajajo statistično značilne razlike. Gibanje estradiola pri treh skupinah glede na odvzem je ponazorjeno v grafikonu 12 ter tabelah 12 in 32.



Grafikon 12: Gibanje povprečnih vrednosti koncentracije serumskega estradiola (nmol/L) pri molznicah v štirih fizioloških obdobjih (odvzemi) v poletnem (I) in zimskem (II) času ter pri tistih s PH (III)

Glede na odvzem so statistično značilni vsi trije kontrasti. Ugotovili smo nagel porast estradiola pri ožjem predporodnem odvzemu, ki mu sledi prav tako naglo znižanje v ožjem poporodnem obdobju. Zniževanje koncentracije se nadaljuje še od 3. do 4. odvzema, kjer so bile izmerjene vrednosti statistično značilno najnižje (tudi glede na 1. in 2. odvzem). Popolnoma enako se je vrednost estradiola spreminjala tudi v poletni skupini krav. Pri zimski skupini je bilo prav tako, le da se povprečna vrednost ob 3. odvzemu ni razlikovala od povprečne vrednosti ob 4. odvzemu. V skupini krav s PH pa nismo ugotovili statistično značilna razlika le med 1. in 4. odvzemom.

Enako dinamiko gibanja koncentracije estradiola so ugotovili tudi Eissa in sod. (1995) ter Patel in sod. (1999).

Iz rezultatov naše študije, lahko vidimo, da je koncentracija serumskih estrogenov višja v obporodnem obdobju, kar verjetno tudi vpliva na aktivacijo osteoblastov in visoko aktivnosti bALP v ožjem poporodnem obdobju. Pri ljudeh je dokazan osteoprotektivni učinek estrogena (Syed in Khosla, 2005) in verjetno vpliva enako tudi na metabolizem kosti pri govedu, kar zagovarjajo številni avtorji (Riggs in sod., 1976; Goff in sod, 1986; Lappeteläinen in sod., 1993; Patel in sod., 1999). Estrogen zmanjšuje odzivnost kosti na PTH, kar onemogoča resorpcijo Ca iz depojev, ki jih predstavljajo kosti, in tudi zmanjšuje sposobnost črevesja, da

resorbira Ca (Riggs in sod., 1976). Zanimivo je, da v naši študiji, tako kot Sasser in sod. (1979), nismo ugotovili statistično značilno višje vrednosti estrogena pred telitvijo pri kravah, ki so obolele za poporodno parezo kot pri tistih, ki niso. Naše ugotovitve se ne ujemajo popolnoma z ugotovitvami Sechen in sod. (1988), ki so 15 do 5 dni pred telitvijo ugotovili statistično značilno višje vrednosti estradiola pri kravah, ki so obolele za poporodno parezo kot pri zdravih, iz česar sklepajo, da ima estradiol pred telitvijo pomembno vlogo v etiologiji bolezni. Bliže telitvi, ob telitvi in do 14 dni po telitvi pa vrednosti estradiola med zdravimi kravami in tistimi, ki so obolele za obporodno parezo niso bile več statistično značilno različne, kar se ujema tudi z našimi rezultati. Pri odvzemu v ožjem poporodnem obdobju so imele krave, ki so obolele za poporodno parezo v naši raziskavi nekoliko višje vrednosti estrogena od zdravih, vendar ne statistično značilno. Zelo podobne rezultate so dobili tudi Sasser in sod. (1979) ter Filipović in sod. (2008).

Glede na to, da so koncentracije estrogena nekoliko nižje pri kravah, ki so obolele za poporodno hipokalcemično parezo že ob prvem odvzemu, obstaja verjetnost, da je pri njih zaradi tega že pred telitvijo prisotna blaga osteoporoza, kot npr. pri ženskah v menopavzi (Riggs in sod., 2002) ali pri ovariektomiranih ovcah (Sigrist in sod., 2007), kar onemogoča ustrezno hitro in intenzivno mobilizacijo kostnega tkiva v času akutnega pomanjkanja Ca po telitvi. Mogoče je to povezano tudi s stresom in povečanim izločanjem glukokortikoidov v času presušitve, ko se krava preseli v drugo skupino, preide na drugačen obrok. Kortikosteroidi znižujejo nivo estrogena v krvi, znižujejo sintezo kostnine in stimulirajo preko blagega povišanja PTH resorpcijo kostnine ter povišanje Ca v krvi (Olney, 2009). Potrebne bi bile dodatne raziskave, ki bi to potrdile.

5.8 VPLIV ESTRADIOLA NA VREDNOSTI Ca, aP, bALP in CTx PRI POSAMEZNIH ODVZEMIH ZA POLETNO IN ZIMSKO SKUPINO KRAV SKUPAJ

Estradiol ima osteoprotektivni učinek in tudi stimulira vgrajevanje Ca v okostje (Sasser in sod., 1979), zato smo pričakovali njegov vpliv na vsebnost mineralov in kazalcev kostnega metabolizma v krvi.

Pri vseh kravah v raziskavi smo ugotovili statistično značilno (τ=-0,34, $p<0,01$) negativno povezanost med Ca in estrogenom in statistično značilno pozitivno povezanost med estrogenom in bALP (τ=0,23, $p<0,05$) pri drugem odvzemu. To podpira ugotovitve, da

estrogen stimulira izgradnjo kostnega tkiva (Syed in Khosla, 2005). Pri prvem in tretjem odvzemu nismo uspeli ugotoviti nikakršne povezave med estrogenom in parametri metabolizma kosti ter minerali. Pri četrtem odvzemu pa smo ponovno ugotovili statistično značilno negativno povezanost med estrogenom in koncentracijo celokupnega Ca ($p<0,05$), na ostale parametre pa estrogen ni imel nikakršnega vpliva. Omenjeni rezultati podpirajo tezo, da ima koncentracija estrogena v obporodnem obdobju krav vlogo pri razvoju hipokalcemične obporodne pareze.

Dokazan je učinek estrogena, da zavira resorpcijo kostnine (Syed in Khosla, 2005). Negativnega vpliva na resorpcijo kostnine naši rezultati ne morejo konsistentno potrditi, saj dosti krav kljub zelo visoki koncentraciji estrogena ni obolelo, druge z nižjo koncentracijo pa so. Ob 4. odvzemu pa smo dobili skoraj statistično značilno pozitivno povezavo med estradiolom in CTx ($\tau=0,20$, $p=0,066$), kar ni v skladu z zaključki Kurosaki in sod. (2007b), ki podpirajo tezo, da je estrogen močan inhibitor resorpcije kostnine, ker ima pri prvesnicah, ki zelo redko zbolijo za parezo, nižje vrednosti kot pri starejših kravah. Krave, ki so obolele za poporodno parezo, so v naši študiji imele v povprečju celo nižje vrednosti estrogena pred telitvijo, kot tiste, ki niso obolele. Možno je, da je vzrok v izraženju estrogenskih receptorjev in odzivu posameznih krav na prisotnost estrogena ali pa v bolj odločilni vlogi estrona. Sasser in sod. (1979) menijo, da je visoka koncentracija estrogena v krvi krav pred telitvijo eden od zaščitnih mehanizmov pred hipokalcemično parezo, saj zaradi stimulacije vgrajevanja Ca v okostje in posledično blage hipokalcemije stimulira izločanje PTH in njegove učinke, ki pa imajo ravno nasprotno delovanje. To omogoči, da so homeostatski mehanizmi po telitvi že pripravljeni, »senzibilizirani«, na večje potrebe po Ca. S to razlago se ujemajo tudi rezultati naše raziskave. Glede na ugotovitve Sechen in sod. (1988) pa menimo, da je za učinkovito aktivacijo metabolizma kosti pomemben predvsem obseg spremembe estradiola od nizkih vrednosti do povišanih v ožjem času pred telitvijo. Če ta ni dovolj izrazit, kot je vidno iz rezultatov omenjenih raziskovalcev, verjetno ne pride do zadostne aktivacije kostnega metabolizma. Dodatno tak odnos nakazujejo v naši raziskavi tudi povezave v 4. odvzemu, ko smo dobili skoraj statistično značilno pozitivno povezavo med estradiolom in CTx ter statistično značilno negativno povezavo med estradiolom in Ca ($\tau=-0,28$, $p<0,05$). Na povezavo med estrogenom in obporodno parezo opozarjajo tudi Pyorala in sod. (1992). Tudi raziskave Kurosaki in sod. (2007b) dodatno krepijo pomen omenjenega hormona v etiologiji bolezni. Rezultati pa so med raziskavami nekoliko nasprotujoči.

Sechen in sod. (1988) so ugotovili tudi pomemben vpliv estrogena na konzumacijo krme, saj se je pri kravah, ki so imele visoke vrednosti estradiola pred telitvijo in so kasneje obolele

konzumacija znižala skoraj še za enkrat več kot pri zdravih kravah v istem fiziološkem obdobju. Bargeloh in sod. (1975) pa so ugotovili direkten negativen vpliv parenteralnega dajanja estrogena na konzumacijo krme. Številni avtorji se zato strinjajo, da estrogen vpliva na pojav poporodne pareze tudi preko negativnega vpliva na konzumacijo krme.

5.9 VPLIV DAJANJA VISOKEGA ODMERKA VITAMINA D_3 OB 2. ODVZEMU NA VREDNOSTI Ca, aP, bALP IN CTx PRI 3. IN 4. ODVZEMU

V skupini krav, ki so i.m. dobile po priporočilu proizvajalca, DUPHAFRAL® D3 1000, 10 milijonov IE vitamina D_3 (holekalciferola) 8 do 2 dni pred telitvijo, je obolelo za obporodno hipokalcemično parezo 15,4% živali (2 od 13 krav), v skupini, ki pa ni dobivala vitamina D_3, pa 30% (6 od 20 krav), kar kaže na klinični pomen in upravičenost dajanja visokih doz vitamina D_3 pred telitvijo. Tudi Zadnik in sod. (2008) ugotavljajo v poskusu na 30 kravah razdeljenih na 3 skupine, da je dajanje visokega odmerka vitamina D_3 pred telitvijo najboljša preventiva poporodne hipokalcemije in z njo povezanih obolenj v primerjavi z dnevnim p.o. dajanjem anionskih soli ali brez preventivnih ukrepov. V skupini krav, ki so dobivale vitamin D_3 je obolela le 1 krava za PH. V skupini, kjer so krave prejemale p.o. anionske soli je ena krava zbolela za PH drugi pa je zaostala posteljica. V kontrolni skupini, brez kakršnihkoli preventivnih ukrepov pred telivijo, je zbolela ena krava za PH, eni je zaostala posteljica, eni se je levo dislociral siriščnik. O 80% učinkovitem preprečevanju poporodne pareze brez komplikacij pri 120 kravah pasme Jersey poročajo tudi Gregorović in sod. (1967), ko so aplicirali 0,4 g kristalinične oblike vitamina D_3 ali 10 milijonov I.E. vit. D_3 parenteralno 5 dni pred predvideno telitvijo s ponovitvami aplikacije vsakih 5 dni do poroda, če se je telitev zavlekla. Ugoden učinek dajanja vitamina D_3 pa najverjetneje ni povezan z bolj aktivnim kataboličnim metabolizmom kostnega tkiva, saj med kravami, ki so dobile vitamin D in tistimi, ki ga niso, ni bilo statistično značilnih razlik v vsebnosti kazalcev kostnega metabolizma v krvnem serumu. Takega mnenja so tudi Goff in sod. (1988). Tudi vsebnost serumskega Ca ni bila pri kravah, ki so dobile vitamin D_3 (Ca=1,95±0,34 mmol/L) statistično značilno višja kot pri tistih, ki ga niso (Ca=1,81±0,39 mmol/L). Dobljeni rezultati se skladajo z rezultati Taylor in sod. (2008), ki kljub dajanju 15 mg 25-hidroksivitamina D eni skupini Jersey krav, drugi pa 15 mg holekalciferola 6 dni pred telitvijo per os, niso ugotovili statistično značilno različnih vrednosti Ca, aP, Mg in osteoklacina kot v kontrolni skupini

krav, ki ni dobivala omenjene terapije. Avtorji smatrajo, da sta bila čas aplikacije in prenizka doza odgovorna za izostanek statistično značilnega učineka v njihovi raziskavi. Predvsem čas učinkovanja bi bil lahko vzrok izostanka učinka tudi v naši študiji, saj so Okura in sod. (2004) ugotovili povišanje Ca že v času od 12 do 72 ur po intravaginalni aplikaciji 1μg/kg telesne teže kalcitriola kravam, kasneje pa ne več. Tudi učinek na koncentracijo Mg je bil le do 48 ur.
Izostanek statistično značilne razlike med skupinama krav si lahko razlagamo tudi z ugotovitvijo Bartona in sod. (1981), da se pri kravah, ki so obolele zaradi obporodne hipokalcemične pareze, že brez terapije koncentracija kalcitriola v krvi poviša dvakrat bolj kot pri kravah, ki niso obolele, in da je bila statistično značilno višja še 7 dni po telitvi.
Tudi Naito in sod. (1990) niso ugotovili nikakršne korelacije med naravno koncentracijo kalcitriola v krvi petih molznic Holstein-Friesijske pasme in koncentracijo osteokalcina, med tem ko je bila koleracija statistično značilna med kalcitriolom in Ca ter aP v obdobju od 5 dni pred telitvijo do 15 dni po telitvi. V naši študiji nismo merili koncentracije kalcitriola, zato težko komentiramo in primerjamo naše ugotovitve z rezultati omenjenih avtorjev.
V naši raziskavi predvidevamo tudi, da krave, ki so bile tretirane z visokim odmerkom holekalciferola, vsega niso pretvorile v aktivno obliko kalcitriol, zaradi česar sta imeli obe skupini na koncu približno enako količino biološko aktivnega vitamina D.
Očitno ima vitamin D_3 ugoden učinek predvsem na druga tkiva in organe, ki pripomorejo, da izrazita hipokalcemija ne privede do pareze. Menimo, da k temu prispeva predvsem ugoden učinek na delovanje muskulature, imunskega sistema in endokrinega dela pankreasa (glej poglavje Biološki procesi, ki jih nadzoruje vitamin D na strani 72).

5.10 NAPOVEDOVANJE VREDNOSTI Ca PO PORODU (3. ODVZEM) S POMOČJO REZULTATOV VREDNOSTI BIOKEMIJSKIH PARAMETROV PRED TELITVIJO (2. ODVZEM)

V obdobju 2 do 10 dni pred predvideno telitvijo smo merili kravam vsebnost Ca, aP, Mg, ALP, bALP, CTx in estradiola v krvnem serumu in vrednosti skušali s pomočjo ROC analize povezati s koncentracijo Ca po telitvi oz. pojavnostjo poporodne hipokalcemične pareze. Po dostopni literaturi do sedaj še nismo zasledili študije, ki bi skušala na osnovi testiranih biokemijskih parametrov pred telitvijo določiti verjetnost, da bo krava po telitvi obolela za poporodno hipokalcemično parezo. Taka informacija bi omogočila zgodnje odkrivanje živali, ki so ogrožene in ciljano zdravljenje, kar bi bistveno pripomoglo k boljšemu počutju živali ter

bolj zdravi čredi na splošno glede na to, da je znana povezanost hipokalcemije z zmanjšanjem aktivnosti imunskega sistema. Predvsem za rejce in celo panogo, ki se ukvarja s prirejo mleka, bi to imelo tudi velik ekonomski učinek. Učinkovitost testa smo opisali tudi s senzitivnostjo in specifičnostjo posameznih razmejitvenih točk. Vse kombinacije senzitivnosti in specifičnosti, ki jih lahko dosežemo s spreminjanjem razmejitvenih točk testa, lahko povzamemo z enim parametrom, to je površina pod ROC krivuljo (Greiner in sod. 2000).

Od vseh biokemijskih paramtrov, ki smo jih preučevali v raziskavi smo lastnost, da lahko iz predporodne vrednosti (dobljene v ožjem predporodnem obdobju) napovemo vrednost Ca po telitvi, ugotovili le pri parametrih bALP in CTx. Zanimivo je, če smo opazovali samo živali v poletnem obdobju, tudi za ta dva parametra nismo mogli ugotoviti njune napovedne vrednosti za razvoj poporodne pareze. Zgleda, da je v našem primeru vpliv gibanja, paše in verjetno tudi klimatskih razmer tako velik, da nekoliko spremeni zakonitosti, ki veljajo v času zimskega načina reje. Možno je, da se zaradi bolj intenzivne fizične aktivnosti spremeni razmerje med kortikalno in trabekularno kostnino na račun kortikalne kostnine, kar ima lahko za poledico fiziološko nekoliko povišano aktivnost kostnega metabolizma predvsem v smislu izgrajevanja kostnine, pa tudi razgrajevanja. Tako tezo nakazuje raziskava, opravljena na teletih, ki so bila nastanjena v boksih in so imela hkrati nekaj intenzivne fizične aktivnosti. Imela so statistično značilno več kortikalne kostnine v metakarpalnih kosteh kot samo zaprta teleta v individualnih boksih ter tudi več od tistih, ki so bila nastanjena v večjih skupinskih boksih, vendar brez posebne fizične aktivnosti (Hiney in sod. 2004). Tudi pri ovcah so ugotovili višje vrednosti bALP poleti kot jeseni, pozimi in spomladi. Dpd (kazalec resorpcije kostnine) pa je dosegel najvišjo vrednost konec poletja. Ovcam se je od spomladi pa do konca poletja statistično značilno povečevala kostna masa (Arens in sod. 2007).

Tudi obsevanje z UV žarki ima vpliv na metabolizem kostnega tkiva. Philipov (1992) navaja, da so imele krave, ki so jih 2 meseca v zimskem času izmenično 10 dni obsevali z UV žarki in 10 dni ne, imele statistično značilno nižjo koncentracijo bALP in osteokalcina kot kontrolna skupina neobsevanih krav. Omenjen vpliv lahko že zaradi fiziološko nekoliko nižjih vrednosti kazalcev izgrajevanja kostnine moti diagnostično vrednost kazalcev kostnega metabolizma tudi v našem primeru. Verjetno ima obsevanje z UV žarki tudi vpliv na CTx, vendar pa nekoliko manjši kot na kazalce izgrajevanja kostnine, saj je bila povezanost s Ca po telitvi tu pri nas zelo blizu statistične značilnosti ($p=0,068$). Ugotovimo lahko, da gibanje na soncu pripomore k bolj uravnoteženemu kostnemu metabolizmu, ki preprečuje nastanek motenj homeostaze mineralov, kar ima za posledico nižjo incidenco puerperalnih parez pri kravah, ki

se lahko v poletnem času pasejo. V poletnem času je v naši študiji obolelo 5 od 20 krav (25%), v zimskem pa 9 od 23 krav (39%).

Pri kravah v zimskem obdobju pa tudi za združeni skupini krav iz zimskega in poletnega obdobja smo dobili do zelo dobre rezultate. Za zimsko obdobje smo izračunali najugodnejšo razmejitveno točko pri testu za ugotavljanje verjetnosti pojava poporodne hipokalcemične pareze na osnovi parametra bALP pri 14,45 U/L. Ta razmejitvena točka nam je dala 80% senzitivnost in 64,3% specifičnost. Test na osnovi merjenja koncentracije CTx pa se je najbolje izkazal pri razmejitveni točki 0,165 ng/mL, kjer je bila senzitivnost 80%, specifičnost pa 85,7%.

Pri združeni skupini krav iz poletnega in zimskega obdobja smo dobili najboljši rezultat testa na osnovi bALP pri razmejitveni točki 13,85 U/L, kjer je bila senzitivnost testa 73,3%, specifičnost pa 51,7%.

Pri združeni skupini krav smo koncentracijo CTx dihotomno kategorizirali v dva razreda in sicer ≥0,121 ng/mL in <0,121 ng/mL. Vrednosti smo analizirali s pomočjo modela univariatne logistične regresije. Tveganje za razvoj poporodne hipokalcemične pareze so pri vrednosti CTx≥0,121 ng/mL 3,8x večje kot pri kravah z nižjo vrednostjo testa.

Zelo zanimivo je, da imajo krave, ki po telitvi obolijo za poporodno hipokalcemično parezo pred telitvijo, višje vrednosti bALP kot krave v poletni in zimski skupini ter višje vrednosti CTx kot krave v zimski skupini in le malenkost nižje kot v poletni skupini. Očitno ima metabolizem kostnega tkiva in Ca pri njih drugačne lastnosti kot pri zdravih kravah. Zgleda, kot da se prej aktivira kot pri zdravih živalih, kasneje po telitvi pa ne more več doseči aktivnosti kotnega metabolizma zdravih krav. Biološka obrazložitev tega fenomena ni očitna.

Test za zgodnje testiranje krav na ogroženost, da bodo obolele za poporodno parezo se je dobro izkazal in predstavlja pomembno novo pridobitev v zgodnji diagnostiki bolezni in omogoča pravočasno preprečevanje bolezni.

5.11 VPLIV KLIMATSKIH RAZMER V ČASU ODVZEMA VZORCEV NA DOBLJENE VREDNOSTI BIOKEMIJSKIH PARAMETROV

Odločitev za ugotavljanje povezanosti med biokemijskimi parametri, povezanimi z metabolizmom kosti in letnim časom ter klimatskimi razmerami, izhaja iz ugotovitev humane medicine, da se kostna gostota glede na letni čas pri ljudeh spreminja. V zimskem času naj bi bila nižja kot v poletnem (Turner 2007). Podobne raziskave za govedo nismo zasledili.

Ugotovitve naše raziskave kažejo, da se merjeni biokemijski parametri ne razlikujejo statistično značilno glede na dejavnik skupina (poletna in zimska skupina). Iz literature pa tudi neformalno številni veterinarji v bujatrični praksi opažajo, da je pojavljanje hipokalcemičnih parez bolj pogosto predvsem ob slabem vremenu in v zimskem času (Houe in sod. 2001). Statistično značilno večji delež poporodnih hipokalcemičnih parez so ugotovili v rejah, kjer so živali vezane, kot v tistih kjer so proste (Hansen in sod., 2007). Tudi v naši raziskavi je v zimskem času, ko so živali stalno v hlevu, vendar proste, obolelo 9 od 23 krav (39%), v poletnem, ko krave vsakodnevno hodijo na pašo, pa 5 od 20 krav (25%). Zato skušamo v naši raziskavi ugotoviti tudi, ali obstaja kakšen fizični dokaz, sprememba v metabolizmu okostja v povezavi z vremenskimi vplivi. Takih podatkov v nam dostopni literaturi nismo zasledili. Roche in Berry (2006) sta pri kravah na paši ugotovila statistično značilen vpliv na bolj pogosto pojavljanje obporodne hipokalcemične pareze, kadar je večja evaporacija, večja razlika med najnižjo in najvišjo dnevno T, če je padla večja količina padavin ali ob nižji minimalni temperaturi trave. Razlika med najvišjo in nanjnižjo dnevno T in količina padavin, ki smo ju merili tudi mi, v naši študiji nista imeli statistično značilnega vpliva na merjene biokemijske parametre. Predvidevamo, da predvsem zaradi tega, ker so bile naše krave za razliko od novozelandskih drugače oskrbovane, pozimi pa tudi vhlevljene.

Pri posameznih odvzemih smo tako v zimskem kot tudi v poletnem obdobju ugotovili statistično značilno povezanost med klimatskimi dejavniki okolja in merjenimi biokemijskimi parametri. Tako so bile v skupini krav v zimskem času izračunane statistično značilne povezave med bALP in CTx ter klimatskimi dejavniki pri drugem odvzemu. Aktivnost bALP je bila pozitivno povezana z najnižjo dnevno T (τ=0,386, p=0,047). CTx pa je bil negativno povezan s povprečnim dnevnim tlakom (τ=-0,510, p=0,009) ter pozitivno s povprečno dnevno T (τ=0,425, p=0,029) in najnižjo dnevno T (τ=0,490, p=0,011). Omenjen rezultat kaže na to, da se ob visokem zračnem tlaku pozimi v ožjem predporodnem obdobju kostnina slabše razgrajuje. Zakaj je prišlo do te povezave si ne znamo razložiti. Ima pa potenencialni vpliv tudi na slabši odziv okostja na hipokalcemijo in verjetno kasneje tudi na večjo verjetnost nastanka hipokalcemične pareze. Zanimivo je, da najnižja dnevna temeperatura pozimi pozitivno korelira s kostni metabolizem, tako sintezo, kot tudi resorpcijo kostnine pri kravah v ožjem predporodnem obdobju. Večja aktivnost kostnega metabolizma ima po našem mnenju ugoden vpliv na vzdrževanje normokalcemije. Izgleda, da ekstremen mraz ne vpliva ugodno na aktivnost kostnega metabolizma. Glede na prejšnjo ugotovitev nekoliko preseneča rezultat pozitivne povezanosti povprečne dnevne T in CTx v zimskem obdobju. Glede na to, da so bile tudi najvišje temperature v zimskem času konstantno v območju termonevtralnega razpona za

govedo, bi pričakovali tudi povezanost z bALP. S stališča vzdrževanja normokalcemije pa je večja resorpcija kostnine ugodna za zmanjšanje verjetnosti hipokalcemije.

Zelo zanimive so ugotovljene povezave pri kravah 10 do 20 dni po telitvi v zimskem obdobju. Vsebnost serumskega Ca je negativno povezana z najvišjo dnevno T (τ=-0,420, p=0,035), med tem ko sta bALP (τ=0,400, p=0,041) in CTx (τ=0,517, p=0,008) pozitivno. Vsebnost serumskega Ca je tudi negativno povezana s povprečno dnevno T (τ=-0,480, p=0,016). Vzrok za to je lahko večja konzumacija krme in s tem tudi mineralov ob hladnejšem vremenu (Sanchez in sod. 1994) in na ta način večja vsebnost Ca v krvi, ki pa ga organizem vgrajuje v okostje ali pa izloča. Zelo močna pozitivna korelacija med najvišjo dnevno T in koncentracijo CTx, kaže na to, da se ob nizki T dovolj Ca zaradi višje konzumacije že resorbira z obroka, zaradi česar je resorpcija kostnine znižana in obratno je konzumacija znižana pri višji temperaturi, kar poveča nadomeščanje mineralov tudi iz okostja. V enakem negativnem statistično značilnem odnosu sta tudi koncentracija serumskega Ca in povprečna dnevna T ter pozitivnem CTx in povprečna dnevna T. Tudi najnižja dnevna T statistično značilno pozitivno korelira s koncentracijo CTx (τ=0,459, p=0,019).

Pri prvem in tretjem odvzemu med klimatskimi dejavniki in merjenimi parametri metabolizma kosti nismo ugotovili statistično značilnih povezav. To si razlagamo z relativno majhnimi potrebami po mineralih v času prvega odvzema in zelo velikim vplivom, ki je dosti močnejši od vremenskega, drugih dejavnikov, ki vplivajo na merjene parametre takoj po telitvi.

V poletnem času smo ugotovili statistično značilne povezave med klimatskimi parametri le pri 2. in 3. odvzemu, to je ravno v času, ko so krave najbolj izpostavljene hipokalcemiji. Pričakovano celokupni serumski Ca ob 2. odvzemu negativno korelira s povprečno dnevno temperaturo (τ=-0,342, p=0,036) in najvišjo dnevno temperaturo (τ=-0,401, p=0,015). To si razlagamo z vročinskim stresom krav, ki zaradi tega konzumirajo manj krme in zato tudi Ca (West 2003, Wheelock in sod. 2010). Nepričakovano pa je nasprotno aktivnost bALP pozitivno povezana z najvišjo dnevno T (τ=0,322, p=0,048). Možno je, da je vzrok za to povišana koncentracija inzulina med vročinskim stresom (Itoh in sod. 1998). Inzulin stimulira nastajanje inzulinu podobnega rastnega faktorja v jetrih, ta pa pozitivno vpliva na sintezo kolagena I osteoblastov (Christenson, 1997). Nasprotno pa aktivnost bALP negativno korelira s povprečno vlago (τ=-0,405, p=0,013) v poletnem času. Povprečna vlaga pa statistično značilno negativno korelira z najvišjo dnevno T (τ=-0,359, p=0,03) in povprečno dnevno T (τ=-0,350, p=0,033), tako da lahko predvidevamo, da gre pri vlagi le za nasprotno korelacijo.

Pri tretjem odvzemu pa ugotavljamo statistično značilno negativno korelacijo med povprečnim dnevnim tlakom in vsebnostjo serumskega Ca (τ=-0,466, p=0,004), aktivnostjo bALP (τ=-0,318, p=0,048) in koncentracijo CTx (τ=-0,385, p=0,017). Očitno ima nizek tlak ob tretjem odvzemu v poletnem času pozitiven vpliv na metabolizem kostnega tkiva in tudi na vsebnost Ca v krvi. Zakaj je prisotna ta povezanost pri tretjem odvzemu, ne znamo razložiti. Možni so direktni vplivi na okostje ali pa posredni preko delovanja na hormonski sistem oz. druga tkiva, ki lahko vplivajo na metabolizem okostja.

6 ZAKLJUČKI

- V poletnem in zimskem obdobju reje krav se vrednosti Ca, aP, Mg, ALP, bALP, CTx in estrogena gibljejo enako.

- Ugotovljena je izrazita, statistično značilna ($p<0,05$) dinamika vseh merjenih parametrov v obporodnem obdobju.

- Od telitve do 20. dneva po telitvi se kostnina najintenzivneje razgrajuje in predstavlja pomemben vir Ca in tudi P za govedo na začetku laktacije.

- Do 48 ur po telitvi je kljub akutnemu pomanjkanju Ca osteoblastna aktivnost zelo velika. Mogoče ima pomen pri utrditvi razrahljanega kostnega ogrodja porodne poti.

- Pri kravah, ki so obolele zaradi poporodne hipokalcemične pareze, so se vrednosti Ca, aP in Mg gibale drugače kot pri zdravih kravah v poletni in zimski skupini.

- Vrednosti ALP, bALP in estrogena se gibljejo enako pri zdravih kravah kot pri kravah, ki so obolele zaradi poporodne hipokalcemične pareze. Vrednosti CTx so se skoraj statistično značilno manj zvišale ($p=0,068$) med 2. in 3. odvzemom pri kravah s poporodno hipokalcemično parezo kot pri zdravih kravah.

- Dajanje visokega odmerka vitamina D_3 8 do 2 dni pred telitvijo klinično zmanjšuje incidenco poporodne hipokalcemične pareze, ne vpliva pa na dinamiko vrednosti Ca, aP, bALP in CTx v obdobju 0 do 48 ur po telitvi ter 10 do 20 dni po telitvi.

- Estradiol je statistično značilno negativno povezan z vrednostjo celokupnega serumskega Ca ter pozitivno z aktivnostjo serumske bALP v ožjem predporodnem obdobju. Tudi 10 do 20 dni po telitvi je estradiol statistično značilno negativno povezan z vrednostmi celokupnega serumskega Ca.

- Z merjenjem bALP in CTx v krvi 10 ali manj dni pred telitvijo se da napovedati, ali bo krava obolela za poporodno hipokalcemično parezo. Pri kravah smo v zimskem času izračunali razmejitveno točko za parameter bALP pri 14,45 U/L, kjer je bila senzitivnost 80%, specifičnost pa 64,3%, za parameter CTx pa pri 0,165 ng/mL, kjer je bila senzitivnost testa 80%, specifičnost pa 85,7%. Pri vseh kravah v raziskavi skupaj (zimska in poletna skupina) smo za aktivnost bALP izračunali razmejitveno točko pri 13,85 U/L, kar je dalo 73,3% senzitivnost in 51,7% specifičnost. Krave, ki so imele CTx več ali enako 0,121 ng/mL, pa so imele kar 3,8x večjo verjetnost, da bodo obolele za poporodno hipokalcemično parezo.

- V naši raziskavi imajo klimatske razmere vpliv na vrednosti Ca, bALP in CTx pri posameznih odvzemih v obporodnem obdobju tako v zimskem kot tudi v poletnem času.

- V zimskem obdobju smo pri 2. odvzemu ugotovili povezanost med bALP in najnižjo dnevno T (τ=0,386, p=0,047), med CTx in povprečnim dnevnim tlakom (τ=-0,510, p=0,009), med CTx in povprečno dnevno T (τ=0,425, p=0,029), med CTx in najnižjo dnevno T (τ=0,490, p=0,011). Pri četrtem odvzemu pa ugotavljamo povezanost med vsebnostjo serumskega Ca in povprečno dnevno T (τ=-0,480, p=0,016), serumskim Ca in najvišjo dnevno T (τ=-0,420, p=0,035), aktivnostjo bALP in najvišjo dnevno T (τ=0,400, p=0,041), koncentracijo CTx in povprečno dnevno T (τ=0,498, p=0,011), CTx in najnižjo dnevno T (τ=0,459, p=0,019), koncentracijo CTx in najvišjo dnevno T (τ=0,517, p=0,008). Pri 1. in 3. odvzemu nismo ugotovili značilnih povezav.

- V poletnem obdobju smo pri 2. odvzemu ugotovili značilno povezanost med koncentracijo serumskega Ca in povprečno dnevno T (τ=-0,342, p=0,036), koncentracijo Ca in najvišjo dnevno T (τ=-0,401, p=0,015), aktivnostjo bALP in povprečno vlago (τ=-0,405, p=0,013) ter bALP in najvišjo dnevno T (τ=0,322, p=0,048). Pri 3. odvzemu pa med koncentracijo Ca in povprečnim tlakom (τ=-0,466, p=0,004), aktivnostjo bALP in povprečnim tlakom (τ=-0,318, p=0,048) ter koncentracijo CTx in povprečnim tlakom (τ=-0,385, p=0,017). Pri prvem in četrtem odvzemu statistično značilne povezanosti nismo ugotovili.

7 POVZETEK

Biokemijski kazalci metabolizma kosti so produkti razgradnje, stranski produkti izgradnje in encimi, ki sodelujejo pri izgradnji ali razgradnji kostnine in se izločajo iz kostnega tkiva v kri. Merimo jih lahko v vzorcih krvi in/ali urina. Njihove vrednosti nam povejo, ali se v času odvzema vzorcev krvi kostnina intenzivneje izgrajuje, razgrajuje ali preoblikuje.

Osnovni namen raziskave je bilo preučevanje aktivnosti metabolizma kosti pri ČB kravah ob različnih pogojih reje in v različnih fizioloških obdobjih ter v skupini krav, ki so obolele za PH s pomočjo spremljanja kazalcev kostnega metabolizma v krvnem serumu. V raziskavi smo merili dva specifična kazalca kostnega metabolizma v krvnem serumu: CTx, specifični produkt osteoklastne aktivnosti in zato kazalec razgradnje kostnine, bALP, specifični produkt osteoblastne aktivnosti in zato kazalce izgrajevanja kostnine ter tudi celokupno ALP, kot manj specifičen kazalec izgrajevanja kostnine, minerale Ca, aP, Mg ter 17β estradiol. Hkrati smo spremljali tudi zdravstveno stanje krav in vremenske parametre (povprečna dnevna temperatura, najnižja dnevna temperatura, najvišja dnevna temperatura, sprememba T (razlika med najvišjo in najnižjo dnevno T), povprečna dnevna vlaga, povprečni dnevni zračni tlak in količina padavin). Preučevali smo tudi vpliv dajanja visokega odmerka vitamina D_3 kravam pred telitvijo na pojavnost poporodne hipokalcemične pareze in metabolizem kosti. V raziskavi nas je zanimalo tudi, ali se da iz vrednosti kazalcev kostnega metabolizma pred telitvijo napovedati, če je krava po telitvi ogrožena, da bo zbolela zaradi obporodne hipokalcemije.

Poskus smo izvedli na farmi krav molznic z intenzivno prirejo mleka, s sistemom proste reje z ležalnimi boksi in pašo v poletnem času. V raziskavo je bilo vključenih 56 krav, ki so bile vsaj pred 4. ali višjo telitvijo. Prvi del poskusa smo opravili v poletnem času, ko se krave vsakodnevno pasejo, drugi del pa v zimskem času, ko so krave stalno vhlevljene. Spremljali smo jih v različnih obporodnih fizioloških obdobjih od 1 meseca pred telitvijo do 10 do 20 dni po telitvi. Vzorce krvi smo vzeli in ocenili zdravstveno stanje krav ob vključitvi v poskus, 1 mesec pred telitvijo ter po tem še 10 ali manj dni pred telitvijo, do 48 ur po telitvi in na koncu 10 do 20 dni po telitvi, ko se je poskus zaključil. Krave, ki so po telitvi obolele zaradi PH, smo vodili kot posebno skupino. Tudi krave, ki so bile preventivno tretirane z visokim odmerkom vitamina D_3 smo po telitvi obravnavali kot posebno skupino. Krvne vzorce smo zdravim kravam jemali vedno ob istem času, dopoldne, kravam s PH pa pred terapijo.

Dobljene vrednosti preiskovanih krvnih parametrov smo statistično obdelali z opisno statistiko in korelacijami. Vse vrednosti spremenljivk, ki se niso normalno porazdeljevale, smo normalizirali, ter ugotavljali vpliv letnega časa, fiziološkega obdobja, PH in preventivnega dajanja visokega odmerka vitamina D_3 na preiskovane parametre (odvisne spremenljivke) s pomočjo analize variance s ponavljanjem. V primeru nenormalne porazdelitve vrednosti spremenljivk smo uporabili neparametrični Friedmanov preizkus. Mnogotere primerjave, kot 'post hoc' analizo, smo izvedli z Bonferronijevo korekcijo p vrednosti oz. v primeru nenormalne porazdelitve podatkov z mnogoterimi Wilcoxonovimi preizkusi predznačenih rangov z Bonferronijevo korekcijo napake prve vrste (α). Pri ugotavljanju napovedne vrednosti parametrov za nastanek PH po telitvi smo uporabili ROC analizo in logistično regresijo.

Ugotovili smo, da fiziološko obdobje ter tudi obolelost za PH statistično značilno ($p<0,05$) vplivata na vrednosti merjenih parametrov. Letni čas (poletje, zima) ni imel vpliva na vrednosti merjenih parametrov. Pri kravah, ki so obolele zaradi PH, so se vrednosti Ca, aP in Mg gibale drugače kot pri zdravih kravah v poletni in zimski skupini. Dajanje visokega odmerka vitamina D_3 8 do 2 dni pred telitvijo klinično zmanjšuje incidenco PH, ne vpliva pa na vrednosti Ca, aP, bALP in CTx v obdobju 0 do 48 ur po telitvi ter 10 do 20 dni po telitvi.

Estradiol je statistično značilno negativno povezan z vrednostjo celokupnega serumskega Ca ter pozitivno z aktivnostjo serumske bALP v ožjem predporodnem obdobju. Tudi 10 do 20 dni po telitvi je estradiol statistično značilno negativno povezan z vrednostmi celokupnega serumskega Ca.

Z merjenjem bALP in CTx v času 10 dni ali manj pred telitvijo se da napovedati, ali bo krava obolela za PH. Pri kravah v zimskem času smo izračunali razmejitveno točko za parameter bALP pri 14,45 U/L, kjer je bila senzitivnost 80%, specifičnost pa 64,3%, za parameter CTx pa pri 0,165 ng/mL, kjer je bila senzitivnost testa 80%, specifičnost pa 85,7%. Pri vseh kravah v raziskavi skupaj (zimska in poletna skupina) smo za parameter bALP izračunali razmejitveno točko pri 13,85 U/L, kar je dalo 73,3% senzitivnost in 51,7% specifičnost. Krave z višjimi vrednostmi bALP in CTx od navedenih v ožjem predporodnem obdobju imajo večjo verjetnost, da bodo po telitvi dobile PH. Krave, ki so imele CTx $\geq$ 0,121 ng/mL, pa so imele kar 3,8x večjo verjetnost, da bodo obolele za PH.

Klimatski dejavniki (predvsem temperature) imajo v določenih fizioloških obdobjih tako v poletnem kot v zimskem času vpliv na vrednosti Ca, bALP in CTx.

Rezultati naše raziskave kažejo na uporabnost biokemijskih kazalcev metabolizma kosti pri zgodnji diagnostiki PH, kar omogoča zgodnje zdravljenje ogroženih krav, še predno pride do

ekonomsko zelo pomembne in za krave dostikrat usodne bolezni. Hkrati so spoznanja raziskave tudi doprinos k razumevanju metabolizma Ca in okostja pri kravah molznicah v obporodnem obdobju.

8 SUMMARY

Biochemical markers of bone metabolism are compounds that are released from bone tissue into the circulation and can be quantified in serum or/and urine samples. They are degradation products, byproducts of formation and enzymes involved in bone resorption or formation. They indicate whether bone is forming, degrading or remodeling more intensively at the time of blood sample collection.

The general aim of the research was to study activity of bone metabolism in Slovenian black and white cows in different managerial conditions, at different physiological periods, in cows that developed milk fever and in cows treated parenerally with high dose of vitamin D_3 before calving, using biochemical markers of bone metabolism in blood serum. Parenteral administration of high doses of vitamin D_3 before calving is well known method for prevention of milk fever. Further predictive values of biochemical markers of bone metabolism before parturition in dairy cows for developing milk fever after calving was evaluated. Two biochemical markers of bone metabolism were measured: bone specific alkaline phosphatase (bALP), a specific product of osteoblasts and therefore bone formation marker and C terminal telopeptide crosslaps of collagen I (CTx), a specific product of osteoclasts and therefore bone resorption marker, beside more classical panel total ALP, minerals Ca, iP, Mg and 17β estradiol. Some climatic parameters (average daily temperature, lowest daily temperature, highest daily temperature, daily temperature difference (difference between daily highest and lowest T), average daily humidity, average daily air pressure and atmospheric precipitations) were also monitored to investigate their influence on measured biochemical parameters.

The study was conducted at a dairy farm with intensive milk production, with loose housing system on cubicles and pasture during warm part of the year. 56 cows before at least the 4th lactation were included in the study. The first part of the study was conducted during summer time when animals were also on pasture every day and the second part during wintertime when animals were indoor all the time. We monitored and obtained blood samples from investigated animals in different physiological periods during periparturient time: 1 month before calving, 10 or less days before calving, within 48 hours after calving and 10 to 20 days in milk. Cows that developed milk fever after calving were included in a separate group. Cows that were treated with high doses of vitamin D_3 before calving were also included in a separate group after calving. All blood samples from healthy cows were taken at the same

time in the morning and from cows with milk fever blood samples were taken before standard therapy. Obtained values of investigated blood biochemical parameters and measured weather parameters were statistically analyzed using descriptive statistics and correlations. All the values that did not distribute normally were normalized and the influence of season, physiological period, milk fever and treatment with high dose of vitamin D_3 on our dependant variables was tested using analysis of variance with repetition. If the factor value was not distributing normally nonparametric Fridman's test was used. Multiple comparisons as "post hoc" analysis were performed using Bonferroni's correction of p-value or in case of not normal distribution of data with multiple Wilcox's tests of ranks with Bonferroni's correction of α error. For calculating predictive value for milk fever after calving from values of measured parameters before calving ROC analysis was employed.

The obtained results show that physiological period and milk fever statistically significantly ($p<0,05$) influence investigated parameters in our study. Season did not have any influence on measured parameters. In cows that developed milk fever after calving, values of Ca, iP and Mg had different dynamic than in healthy cows in summer and winter group. Treatment of cows with high dose of vitamin D_3 before calving reduced incidence of milk fever but did not had significant influence on blood total Ca, iP, bALP and CTx within 48 hours after calving and 10 to 20 days after calving.

17β estradiol was statistically significantly negatively correlated with total blood Ca and positively with activity of blood bALP during 10 or less days before calving. Statistically significant negative correlation was calculated also with total blood Ca 10 to 20 days after calving.

By measuring blood bALP and CTx 10 or less days before calving, it is possible to predict if a cow is at risk of developing milk fever after calving. For the winter group cut-off point for bALP was calculated at 14,45 U/L with 80% sensitivity and 64,3% specificity and for CTx at 0,165 ng/mL with 80% sensitivity and 85,7% specificity. For the joined group (winter + summer group) cut-off point for bALP was at 13,85 U/L, sensitivity was 73,3% and specificity 51,7%. Therefore, cows with higher values of bALP and CTx than proposed cut off values before calving are at greater risk of developing milk fever. For CTx in joined group we calculated a threshold value of 0,121 ng/mL, which was connected to 3,8 x higher risk if the same or higher, that cow would develop milk fever after calving.

Weather parameters, especially temperature, have influence on total Ca, bALP and CTx during certain physiological periods in winter and summer groups in our study.

From the results obtained in present study, potential uses of biochemical markers of bone metabolism in early diagnostics of milk fever are proposed. Early detection of cows at risk of developing milk fever after calving enables employment of preventive measures for targeted animals. This would prevent economic losses due to life threatening disease milk fever and reduce costs for preventive measures. Besides knowledge obtained in the study further contributes to understanding of Ca and bone metabolism in dairy cattle during periparturient time.

9 ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem:

- mentorju prof. dr. Tomažu Zadniku za vodstvo pri izdelavi doktorske disertacije,
- ga. Miji Sirk in g. Alešu Pintarju iz Farme Grmače za izredno predanost in skrbnost pri izboru in spremljanju krav v poskusu,
- g. Stanetu Cvetežarju, direktorju Farme Grmače, ker mi je omogočil spremljanje metabolizma kosti pri kravah na farmi,
- g. Čedotu Bursaču in dr. Jožici Ježek dr.vet.med. za sodelovanje pri zbiranju vzorcev,
- mag. Mariji Nemec, dr. vet. med. za opravljene biokemijske preiskave krvnega seruma,
- dr. Ivici Avberšek Lužnik za opravljene preiskave krvnega seruma na kostno specifične kazalce metabolizma kosti,
- ga. Bernardi Dobnikar in ga. Barbari Podmeninšek za skrbno pripravo vzorcev za preiskave,
- g. Miranu Kukovici, dr. vet. med. za pomoč pri zbiranju vzorcev krvi od krav s poporodno parezo,
- prof. dr. Milki Vrecl, dr. vet. med. za fotografije histoloških preparatov kosti,
- mag. Marjanu Martinčiču, EMONA za rezultate kemijskih analiz krme iz Farme Grmače
- laboratoriju Nuklearne medicine UKC za določitev estradiola v krvnem serumu krav,
- g. Borisu Zupančiču iz Agencije Republike Slovenije za okolje za vremenske podatke v času poiskusa,
- dr. Mojci Čižek Sajko za pomoč pri statistični obdelavi podatkov,
- ga. Nevenki Drusany za lektoriranje teksta,
- prof. dr. Martini Klinkon, prof. dr. Zvonku Stojeviću in prof. dr. Milanu Pogačniku za konstruktivne pripombe pri izdelavi disertacije,
- mag. Giti Grecs-Smole za pregled bibliografskih podatkov,
- Vetconsult pharmi, Ljubljana, ki mi je brezplačno priskrbela preparat Duphapral® D_3 1000 (Fort Dodge, Španija) za raziskavo.

Za podporo pri izdelavi naloge se še posebej zahvaljujem svoji družini, ki mi je stalno stala ob strani in me podpirala pri delu.

10 REFERENCE

Allen MJ (2003). Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. Vet Clin Pathol 32: 101-13.

Allen WM, Sansom BF (1993). Parturient paresis (milk fever) and hypocalcemia (cows, ewes and goats). In: Howard JL, ed. Current veterinary therapy 3, Food animal practice 3. ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 304-7.

Ammerman CB, Chicco CF, Moore JE, Van Walleghem PA, Arrington LR (1971). Effect of dietary magnesium on voluntary feed intake and rumen fermentations.
J Dairy Sci 54: 1288-93.

Anderson PT (1991). Trenbolone acetate as a growth promotant.
Compend Contin Educ Pract Vet 13: 1179-90.

Andrews AH (1992). The downer cow. Vet Annu 32: 242-9.

Arens D, Sigrist I, Alini M, Schawalder P, Schneider E, Egermann M (2007). Seasonal changes in bone metabolism in sheep. Vet J 174(3): 585-91.

Axford RF, Tas MV, Evans RA, Offer NW (1975). The absorption of magnesium from the forestomachs, stomach and small intestine of sheep. Res Vet Sci 19: 333-4.

Baker RM, Boston RC, Boyes TE, Leaver DD (1979). Variations in the response of sheep to experimental magnesium deficiency. Res Vet Sci 26: 129-33.

Bar A, Sachs M, Hurwitz S (1980). Observations on the use of 1αhydroxy-cholecaciferol in the prevention of bovine parturient paresis. Vet Rec 106: 529-32.

Bargeloh JF, Hibbs JW, Conrad HR (1975). Effect of prepartal hormone administration on feed intake and mineral metabolism of cows. J Dairy Sci 58(11): 1701-7.

Barton BA, Horst RL, Jorgensen NA, DeLuca HF (1981). Concentration of calcium, phosphorus, and 1,25-dihydroxyvitamin D in plasma of dairy cows during the lactation cycle. J Dairy Sci 64(5): 850-2.

Barton BA, Hodnett DW, Jorgensen NA, DeLuca HF (1984). 24,25-dihydroxyvitamin D3 administration increases incidence of parturient paresis. J Dairy Sci 67(6): 1236-9.

Bauman DE, Currie WB (1980). Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. J Dairy Sci 63(9): 1514-29.

Beighle DE (1999). The effect of gestation and lactation on bone calcium, phosphorus and magnesium in dairy cows. J S Afr Vet Assoc 70: 142-6.

Bigras-Poulin M, Tremblay A (1998). An epidemiological study of calcium metabolism in non-paretic postparturient Holstein cows. Prev Vet Med 35: 195-207.

Bikle MD P (1997). Biochemical markers in the assessment of bone disease. Am J Med 103: 427-36.

Billinghurst RC, Brama PAJ, van Weeren PR, Knowlton MS, McIlwraith CW (2003). Significant exercise-related changes in the serum levels of two biomarkers of collagen metabolism in young horses. Osteoarthr Cartil 11: 760-9.

Bjarnason NH, Henriksen EEG, Alexandersen P, Christgau S, Henriksen DB, Christiansen C (2002). Mechanism of circadian variation in bone resorption. Bone 30: 307-13.

Black HE, Capen CC (1971). Urinary and plasma hydroxyproline during pregnancy, parturition and lactation in cows with parturient hypocalcemia. Metabolism 20: 337-44.

Blendinger W (1917). Gedanken zum Kapitel, Ätiologie der Gebärparese. Münch Tierärztl Wochenschr 68: 556-8.

Boyce BF, Xing L (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. Arch Biochem Biophys 473(2): 139-46.

van de Braak AE, Van't Klooster AT, Goedegebuure SA, Faber JA (1987a). Effects of calcium and magnesium intakes and feeding level during the dry period on bone resorption in dairy cows at parturition. Res Vet Sci 43(1): 7-12.

van de Braak AE, van't Klooster AT, Malestein A (1987b). Influence of a deficient supply of magnesium during the dry period on the rate of calcium mobilisation by dairy cows at parturition. Res Vet Sci 42(1): 101-8.

Braithwaite GD (1983a). Calcium and phosphorus requirements of the ewe during pregnancy and lactation. 1. Calcium. Br J Nutr 50: 711-22.

Braithwaite GD (1983b). Calcium and phosphorus requirements of the ewe during pregnancy and lactation. 2. Phosphorus. Br J Nutr 50: 723-36.

Breves G, Goff JP, Schroder B, Horst RL (1995). Gastrointestinal calcium and phosphate metabolism in ruminants. Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction. Albany, Germany: Delmar Publishers,100-51.

Breves G, Schroder B (1991). Comparative aspects of gastrointestinal phosphorus metabolism. Nutr Res Rev 4: 95-140.

Bronner F (1987). Intestinal calcium absorption: mechanisms and applications. J Nutr 117: 1347-52.

Bronner F (2003). Mechanisms of intestinal calcium absorption. J Cell Biochem 88: 387-93.

Brzoska MM, Moniuszko-Jakoniuk J (2005). Disorders in bone metabolism of female rats chronically exposed to cadmium. Toxicol Appl Pharmacol 202: 68-83.

Care AD (1994). The absorption of phosphate from the digestive tract of ruminant animals. Br Vet J 150: 197-205.

Carlstrom G (1970). Studies on parturient paresis in dairy cows. 5. On the composition and calcium binding capacity of two bovine serum protein fractions, with special regard to parturient paresis. Acta Vet Scand 11: 89-102.

Challa J, Braithwaite GD (1989). Phosphorus and calcium metabolism in growing calves with special emphasis on phosphorus homeostasis. 4. Studies on milk-fed calves given different amounts of dietary phosphorus but a constant intake of calcium. J Agric Sci 113: 285-9.

Chester-Jones H, Fontenot JP, Veit HP (1990). Physiological and pathological effects of feeding high levels of magnesium to steers. J Anim Sci 68: 4400-13.

Chiappe AM, Capaul EG (1985). Plasma values of hydroxyproline in relation to parturition in the dairy cow: its possible application in the early diagnosis of puerperal paresis. Rev Med Vet Argentina 66: 302-7.

Christenson RH (1997). Biochemical markers of bone metabolism: an overview. Clin Biochem 30: 573-93.

Clowes JA, Hannon RA, Yap TS, Hoyle NR, Blumsohn A, Eastell R (2002). Effect of feeding on bone turnover markers and its impact on biological variability of measurements. Bone 30: 886-90.

Coates DB, Ternouth JH (1992). Phosphorus kinetics of cattle grazing tropical pastures and implications for the estimation of their phosphorus requirements. J Agric Sci 119(3): 401-9.

Constable PD (1999). Clinical assessment of acid-base status: strong ion difference theory. Vet Clin North Am Food Anim Pract 15(3): 447-71.

Cook GM, Wells JE, Russell JB (1994). Ability of Acidaminococcus fermentans to oxidize trans-aconitate and decrease the accumulation of tricarballylate, a toxic end product of ruminal fermentation. Appl Environ Microbiol 60(7): 2533-7.

Correa MT, Erb H, Scarlett J (1993). Path analysis for seven postpartum disorders of Holstein cows. J Dairy Sci 76(5): 1305-12.

Cox VS (1982). Pathogenesis of the downer cow syndrome. Vet Rec 111: 76–9.

Cundy T, Reid I (1995). Calcium, phosphate and magnesium. In: Marshall WJ, Bangert SK (eds.). Clinical biochemistry: metabolic and clinical spects. New York: Churchill Livingstone, 87 -116.

Curtis CR, Erb HN, Sniffen CJ et al. (1983). Association of parturient hypocalcemia with eight periparturient disorders in Holstein cows. J Am Vet Assoc 183(5): 559-66.

Curtis CR, Erb HN, Sniffen CJ, Smith RD (1984). Epidemiology of parturienmt paresis: predisposing factors with emphasis on dry cow feeding and management. J Dairy Sci 64(4): 817-25.

Dalley DE, Isherwood P, Sykes AR, Robson AB (1997a). Effect of in vitro manipulation of pH on magnesium solubility in ruminal and caecal digesta in sheep. J Agric Sci 129: 107-11.

Dalley DE, Isherwood P, Sykes AR, Robson AB (1997b). Effect of intraruminal infusion of potassium on the site of magnesium absorption within the digestive tract in sheep. J Agric Sci 129: 99-105.

Davicco MJ, Coxam V, Roux R, Barlet JP (1990). Plasma osteocalcin concentrations in cattle under various pathophysiological conditions. Bone Mineral 10: 131-7.

DeGaris PJ, Lean IJ (2008). Milk fever in dairy cows: a review of pathophysiology and control principles. Vet J 176: 58–69.

Delmas PD (1993). Biochemical markers of bone turnover I: theoretical considerations and clinical use in osteoporosis. Am J Med 95: S11-6.

Denis I, Cournot G, Lacroix H, Colin C, Zerath E, Pointillart A (2000). In vivo bone metabolism and ex vivo bone marrow osteoprogenitors in vitamin D-deprived pigs. Bone 26: 491-8.

Devlin TM (1997). Textbook of biochemistry: with clinical correlations. New York: Wiley-Liss, 50-4.

Ebel H, Gunther T (1980). Magnesium metabolism: a review. J Clin Chem Clin Biochem 18: 257-70.

Egermann M, Goldhahn J, Holz R, Schneider E, Lill CA (2008). A sheep model for fracture treatment in osteoporosis: benefits of the model versus animal welfare. Lab Anim 42(4): 453-64.

Eissa HM, el-Belely MS, Ghoneim IM, Ezzo OH (1995). Plasma progesterone, oestradiol-17 beta, oestrone sulphate, corticosteroids and a metabolite of PGF2 alpha: evolution throughout pregnancy, before, during and after parturition in buffalo cows. Vet Res 26(4): 310-8.

Ekelund A (2003). Phosphorus and the dairy cow - influence of intake level, source and stage of lactation on apparent digestibility and bone turnover. Uppsala: Swedish university of agriculture science. Doctoral thesis.

Ellenberger HB, Newlander JA, Jones CH (1950). Composition of the bodies of dairy cows. Vt Agric Exp Stn Bull 588: 1–66.

Erb HN, Smith RD, Oltenacu PA, Guard CL, Hillman RB, Powers PA, Smith MC, White ME (1985). Path model of reproductive disorders and performance, milk fever, mastitis, milk yield, and culling in Holstein cows. J Dairy Sci 68(12): 3337-49.

Eriksen EF, Charles P, Melsen F, Mosekilde L, Risteli L, Risteli J (1993). Serum markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease: correlation with bone histomorphometry. J Bone Miner Res 8(2): 127-32.

Farhan S, Sudeep K (2005). Mechanisms of steroid effects on bone. Biochem Biophys Res Commun 328(3): 688-96.

Fatur B (1994). Ca, P, Mg and Na levels of dairy cows with subclinical ketosis. In: Proceedings of the 18th World Buiatrics Congress. Bologna: Societa Italiana di Buiatria, 260.

Field AC, Suttle NF, Nisbet DI (1975). Effect of diets low in calcium and phosphorus on the development of growing lambs. J Agric Sci 85(3): 435-42.

Field AC, Wooliams JA, Wooliams C (1986). The Effect of breed of sire on the urinary excretion of phosphorus and magnesium in lambs. Anim Prod 42: 349-54.

Filipović N, Stojević Z, Zdelar-Turk M, Kušec V (2008). Plasma parathyroid hormone-related peptide and bone metabolism in periparturient dairy cows. Acta Vet Hung 56(2): 235–44.

Fontenot JP, Allen VG, Bunce GE, Goff JP (1989). Factors influencing magnesium absorption and metabolism in ruminants. J Anim Sci 67: 3445-55.

Foster A, Livesey C, Edwards G (2007). Magnesium disorders in ruminants. In Pract 29: 534-9.

Fromm M, Hierholzer K (2000). Niere. In: v. Engelhardt W, Breves G, eds. Physiologie der Haustiere. Stuttgart: Enke, 254-88.

Gallagher JC (2008). Advances in bone biology and new treatments for bone loss. Maturitas 60(1): 65-9.

Gašperlin B (2000).Vpliv anionov in kationov v krmnem obroku na pojav poporodne pareze molznic. Ljubljana: Veterinarska fakulteta. Doktorska naloga.

Gašperlin B, Zadnik T, Jazbec I, Žust J (2002). Effect of dietary cation-anion differences on serum calcium, phosphorus and magnesium concentrations in parturient dairy cows. Slov Vet Res 39: 215-25.

Gaynor PJ (1989). Parturient hypocalemia in jersey cows fed alfalfa haylage based diets with different cation to anion rations. J Dairy Sci 72: 2525-31.

Gerloff BJ, Swenson EP (1996). Acute recumbency and marginal phosphorus deficiency in dairy cattle. J Am Vet Med Assoc 208: 716-9.

Gild C, Alpert N, Van-Straten M (2008). The influence of subclinical hypocalcemia on production and reproduction parameters in Israeli dairy herds. Hung Vet J 130 (Supl II): 4-5.

Givens DI, Everington JM, Adamson AH (1990). The nutritive value of spring-grown herbage produced on farms throughout England and Wales over 4 years. 2. The prediction of apparent digestibility in vivo from various laboratory measurements. Anim Feed Sci Technol 27: 173-84.

Goff JP (1999). Mastitis and retained placenta - relationship to bovine immunology and nutrition. Adv Dairy Technol 11: 185-92.

Goff JP (2000). Pathophysiology of calcium and phosphorus disorders. Vet Clin North Am Food Anim Pract 16: 319-37.

Goff JP (2003). Managing hypocalcemia and milk fever. Cattle Pract 11(2): 75-9.

Goff JP (2004). Macromineral disorders of the transition cow. Vet Clin North Am Food Anim Pract 20: 471-94.

Goff JP (2006). Macromineral physiology and application to the feeding of the dairy cow for revention of milk fever and other periparturient mineral disorders.
Anim Feed Sci Tech 126: 237–57.

Goff JP (2006a). Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. J Dairy Sci 89(4): 1292-301.

Goff JP (2008). The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. Vet J 176(1): 50-7.

Goff JP, Horst RL, Littledike ET, Boris A, Uskokovic MR (1986). Bone resorption, renal function and mineral status in cows treated with 1,25-dihydroxycholecalciferol and its 24-fluoro analogues. J Nutr 116: 1500-10.

Goff JP, Horst RL, Reinhardt TA (1987).The pathophysiology and prevention of milk fever.Vet Med 88: 943-50.

Goff JP, Horst RL, Beitz DC, Littledike ET (1988). Use of 24-F-1,25-dihydroxyvitamin D3 to prevent parturient paresis in dairy cows. J Dairy Sci 71: 1211-9.

Goff JP, Kehrli ME, Horst RL (1989). Periparturient hypocalcemia in cows: prevention using intramuscular parathyroid hormone. J Dairy Sci 72(5): 1182-7.

Goff JP, Reinhardt TA, Horst RL (1991). Enzymes and factors controlling vitamin D metabolism and action in normal and milk fever cows. J Dairy Sci 74: 4022–32.

Goff JP, Horst RL (1993). Oral administration of calcium salts for treatment of hypocalcemia in cattle. J Dairy Sci 76: 101-8.

Goff JP, Reinhardt TA, Horst RL (1995). Milk fever and dietary cation-anion balance effects on concentration of vitamin D receptor in tissue of periparturient dairy cows.
J Dairy Sci 78: 2388-94.

Goff JP, Horst RL, Jardon PW, Borelli C, Wedam J (1996). Field trials of an oral calcium propionate paste as an aid to prevent milk fever in periparturient dairy cows.
J Dairy Sci 79: 378-83.

Goff JP, Horst RL (1997). Effects of the addition of potassium or sodium, but not calcium, to prepartum ratios on milk fever in dairy cows. J Dairy Sci 80: 176-86.

Goff JP, Kimura K, Horst RL (2002). Effect of mastectomy on milk fever, energy and vitamins A, E and β carotene status at parturition. J Dairy Sci 85(6): 1427-36.

Goings RL, Jacobson NL, Beitz DC, Littledike ET, Wiggers KD (1974). Prevention of parturient paresis by a prepartum, calcium-deficient diet. J Dairy Sci 57(10): 1184-8.

Goltzman D (2008). Studies on the mechanism of the skeletal anabolic action of endogenous and exogenous parathyroid hormone. Arch Bichem Biophys 473: 218-24.

Grafenau P, Eicher R, Uebelhart B, Tschudi P, Lepage OM (1999). General anaesthesia decreases osteocalcin plasma concentrations in horses. Equine Vet J 31(6): 533-6.

Green HB, Horst RL, Beitz DC, Littledike ET (1981). Vitamin D metabolites in plasma of cows fed a prepartum low-calcium diet for prevention of parturient hypocalcemia. J Dairy Sci 64(2): 217-26.

Greene LW, Fontenot JP, Webb KE, Jr. (1983). Effect of dietary potassium on absorption of magnesium and other macroelements in sheep fed different levels of magnesium. J Anim Sci 56: 1208-13.

Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD (2000). Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. Prev Vet Med 45(1/2): 23-41.

Gregorović V (1992). Bolezni in zdravstveno varstvo prežvekovalcev. Organske, presnovne in deficitarne bolezni: del 1. 4. izd. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 478-545.

Gregorović V, Bekš L (1962). Wirkung von Kristallinen Vitamin D_3 in gelöster Form zum Vorbeuge der hypocalzämischen Gebärparese bei Kühen. Dtsch Tierärztl Wochenschr 69: 442-5.

Gregorović V, Skušek F, Kešnar F, Bekš L (1967). Crystalline vitamin D3 for the prevention of milk fever in cattle. Vet Rec 81:161-2.

Gregorović V, Jazbec I, Skušek F, Dolenc A (1975). Prispevek k terapiji puerperalne pareze pri kravah. Zb Biotehn Fak UL Vet 12: 13-22.

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.

Guterbock WM (2004). Diagnosis and treatment programs for fresh cows. Vet Clin North Am Food Anim Pract 20: 605-26.

Hanai H, Brennan DP, Cheng L et al. (1990). Downregulation of parathyroid hormone receptors in renal membranes from aged rats. Am J Physiol 259: F444-50.

Hannon RA, Blumsohn A, Smith TWD, Eastell R (1995). The effect of fracture heating on biochemical markers of bone turnover. Bone 16: 691.

Hansen SS, Ersbøll AK, Blom JY, Jørgensen RJ (2007). Preventive strategies and risk factors for milk fever in Danish dairy herds: a questionnaire survey. Prev Vet Med 80(4): 271-86.

Hara S, Ikegaya Y, Jørgensen RJ, Sasaki J, Nakamura M, Tomizawa N (2003). Effect of induced subclinical hypocalcemia on the motility of bovine digestive tract. Acta Vet Scand Suppl 98: 251.

Harris DJ (1981). Factors predisposing to parturient paresis. Aust Vet J 57(8): 357-61.

Henry JC, Cooper SR, Freeman DW, Kropp JR (2002). Effects of exercise on bone density, growth parameters and biochemical markers of bone metabolism in yearling quarter horses. In: Animal science research report. Agricultural Experiment Station, Oklahoma State University, P-993, 26.

Hess E (1905). Über Gebärparese, Puerperaleseptikämie und Festliegen nach der Geburt. Schweizer Arch Tierheilkd 47: 229-55.

Heuer C, Schukken YH, Dobbelaar P (1999). Postpartum body condition score and results from the first test day milk as predictors of disease, fertility, yield, and culling in commercial dairy herds. J Dairy Sci 82(2): 295-304.

Hibbs JW, Pounden WD, Krauss WE (1947). Further studies on the effect of vitamin D and parathyroid extract "Paroidin" on blood changes of normal and milk fever cows at parturition. J Dairy Sci 30: 564-6.

Hibbs JW, Conrad HR (1960). Studies of milk fever in dairy cows: 6. Effect of 3 prepartal dosage levels of vitamin-D on milk fever incidence. J Dairy Sci 43: 1124-9.

Hiney KM, Nielsen BD, Rosenstein D, Orth MW, Marks BP (2004). High-intensity exercise of short duration alters bovine bone density and shape. J Anim Sci 82: 1612-20.

Hirsch PF, Imai Y, Hosoya Y, Ode H, Maeda S (1998). Glucocorticoids possess calcitonin-like antihypercalcemic properties in rats. Endocrine 8: 29–36.

Hoenderop JG, Muller D, van der Kemp AW, et al. (2001). Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney. J Am Soc Nephrol 12(2): 1342-9.

Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ (2003). Epithelial calcium channels: from identification to function and regulation. Pflugers Arch 446(3): 304-8.

Höller H, Breves G, Kocabatmaz M, Gerdes H (1988). Flux of calcium across the sheep rumen wall in vivo and in vitro. Q J Exp Physiol 73(4): 609-18.

Holtenius K, Ekelund A (2005). Biochemical markers of bone turnover in the dairy cow during lactation and the dry period. Res Vet Sci 78: 17-9.

Horst RL, Jorgensen NA, DeLuca HF (1978). Plasma 1,25-dihydroxyvitamin D and parathyroid hormone levels in paretic dairy cows. Am J Physiol 235(6): E634-7.

Horst RL, Reinhardt TA (1983). Vitamin D metabolism in ruminants and its relevance to the periparturient cow. J Dairy Sci 66(4): 661-78.

Horst RL (1986). Regulation of calcium and phosphorus homeostasis in the dairy cow. J Dairy Sci 69: 604-16.

Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA (1990). Advancing age results in reduction of intestinal and bone 1,25-dihydroxyvitamin D receptor. Endocrinology 126(2): 1053-7.

Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA (1994). Calcium and vitamin D metabolism in the dairy cow. J Dairy Sci 77: 1936-51.

Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA, Buxton DR (1997). Strategies for preventing milk fever in dairy cattle. J Dairy Sci 80: 1269-80.

Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA (2003a). Role of vitamin D in calcium homeostasis and its use in prevention of bovine periparturient paresis. Acta Vet Scand Suppl 97: 35-50.

Horst RL, Goff JP, Gill S, Dallorso ME, Pawlak E (2003b). Using *Solanum glaucophyllum* as a source of 1,25-dihydroksyvitamin D to prevent hypocalcemia in dairy cows.
Acta Vet Scand Suppl 98: 242.

Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA (2005). Adapting to the ransition between gestation and lactation: differences between rat, human and dairy cow.
J Mammary Gland Biol Neoplasia 10(2): 141-56.

Houe H, Ostergaard S, Thilsing-Hansen T, et al. (2001). Milk fever and subclinical hypocalcaemia: an evaluation of parameters on incidence risk, diagnosis, risk factors and biological effects as input for decision support system for disease control.
Acta Vet Scand 42: 1-29.

House WA, Bell AW (1993). Mineral accretion in the fetus and adnexa during late gestation in Holstein cows. J Dairy Sci 76: 2999-3010.

Hove K (1986). Cyclic changes in plasma calcium and the calcium homeostatic endocrine system of the postparturient dairy cow. J Dairy Sci 69: 2072-82.

Huber TL, Wilson RC, Stattelman AJ, Goetsch DD (1981). Effect of hypocalcemia on motility of the ruminant stomach. Am J Vet Res 42(9): 1488-90.

Husband J (2005). Strategies for control of milk fever. In Pract 27: 88-92.

Igarashi Y, Lee MY, Matsuzaki S (2002). Acid phosphatases as markers of bone metabolism. J Chromatogr B 781: 345-58.

Inoue M, Tanaka H, Moriwake T, Oka M, Sekiguchi C, Seino Y (2000). Altered biochemical markers of bone turnover in humans during 120 days of bed rest. Bone 26: 281-6.

Itoh F, Obara Y, Rose MT, Fuse H, Hashimoto H (1998). Insulin and glucagon secretion in lactating cows during heat exposure. J Anim Sci 76(8): 2182-9.

Iwama Y, Kamiya M, Tanaka M, Shioya S (2004). The change in dry matter intake, milk yield and bone turnover of primiparous cows as compared with multiparous cows during early lactation. Anim Sci J 75: 213-8.

Jackson BF, Blumsohn A, Goodship AE, Wilson AM, Price JS (2003).Circadian variation in biochemical markers of bone cell activity and insulin-like growth factor-I in two-year-old horses. J Anim Sci 81: 2804-10.

Jazbec I (1990). Klinično laboratorijska diagnostika.
Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 137-47.

Jazbec I, Gregorović V, Bekš L (1970). Učinek velikih doz kristaličnega vitamina D na nihanje koncentracije serumskega Ca in anorganskega P pri kravah, neposredno ogroženih od hipokalcemične puerperalne pareze. Zb Biotehn Fak UL Vet 7: 59-69.

Jazbec I, Gregorović V, Bekš L (1971). Nihanje aktivnosti alkalne fosfataze in koncentracije Mg v krvnem serumu pri i/m aplikaciji velikih doz kristaličnega vit. D_3 kravam, ki so

neposredno ogrožene od hipoklacemične poporodne mrzlice.
Zb Biotehn Fak UL Vet 8: 41-53.

Jones RJ, Betteridge K (1994). Effect of superphosphate, or its component elements (phosphorus, sulfur, and calcium), on the grazing preference of steers on a tropical grass-legume pasture grown on a low phosphorus soil. Aust J Exp Agric 34: 349-53.

Jonsson NN (1999). The effects of subclinical hypocalcaemia on postpartum fertility. Cattle Pract 7(3): 255-60.

Jorgensen NA (1974). Combating milk fever. J Dairy Sci 57: 933-44.

Jubb TF, Jerrett IV, Browning JW, Thomas KW (1990). Haemoglobinuria and hypophosphataemia in postparturient dairy cows without dietary deficiency of phosphorus. Aust Vet J 67(3): 86-9.

Kamgarpour R, Daniel RCW, Fenwick DC, McGuigan K, Murphy C (1999). Post partum subclinical hypocalcaemia and effects on ovarian function and uterine involution in a dairy herd. Vet J 158:59-67.

Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (1997). Clinical biochemistry of domestic animals. San Diego: Academic Press, 619-74.

Kanzawa M, Sugimoto T, Kanatani M, Chihara K (2000). Involvement of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor in the stimulation of osteoclast formation by parathyroid hormone in mouse bone cells. Eur J Endocrinol 142(6): 661-4.

Khan SN, Bostrom MP, Lane JM (2000). Bone growth factors.
Orthop Clin North Am 31(3): 375-88.

Kichura TS, Horst RL, Beitz DC, Littledike ET (1982). Relationships between prepartal dietary calcium and phosphorus, vitamin D metabolism, and parturient paresis in dairy cows. J Nutr 112(3): 480-7.

Kimura K, Reinhardt TA, Goff JP (2006). Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. J Dairy Sci 89(7): 2588-95.

Klinkon Z, Klinkon M, Jazbec I (1994). Metabolični profil pri kravah s klinično poporodno parezo. Vet Nov 20: 294-6.

Komnenou A, Karayannopoulou M, Polizopoulou ZS, Constantinidis TC, Dessiris A (2005). Correlation of serum alkaline phosphatase activity with the healing process of long bone fractures in dogs. Vet Clin Pathol 34: 35-8.

Koshy KT (1982). Vitamin D: an update. J Pharm Sci 71(2): 137-53.

Kossaibati MA, Esslemont RJ (1997). The costs of production diseases in dairy herds in England. Vet J 154: 41-51.

Kovacs CS (2005). Calcium and bone metabolism during pregnancy and lactation.
J Mammary Gland Biol Neoplasia 10(2): 105-18.

Kronfeld DS (1971). Parturient hypocalcemia in dairy cows.
Adv Vet Sci Comp Med 15: 133-57.

Kurosaki N, Yamato O, Sato J, et al. (2007a). Biomarkers for the activation of calcium metabolism in dairy cows: elevation of tartrate-resistant acid phosphatase activity by lowering dietary cation-anion difference is associated with the prevention of milk fever.
J Vet Med Sci 69(3): 265-70.

Kurosaki N, Yamato O, Sasamoto Y, et al. (2007b). Clinico-pathological findings in peripartum dairy cows fed anion salts lowering the dietary cation-anion difference: involvement of serum inorganic phosphorus, chloride and plasma estrogen concentrations in milk fever. Jpn J Vet Res 55(1): 3-12.

Lappeteläinen R, Lappetelainen E, Hassinen T, Mahl M, Pirskanen A, Maenpaa PH (1993). Biochemical indicators of bone metabolic activity in bovine periparturient hypocalcemia.
J Vet Med 40: 67-72.

Larsen T, Moller G, Bellio R (2001). Evaluation of clinical and clinical chemical parameters in periparturient cows. J Dairy Sci 84: 1749-58.

Lean IJ, DeGaris PJ, McNeil DM, Block E (2006). Hypocalcemia in dairy cows: meta-analysis and dietary cation anion difference theory revisited. J Dairy Sci 89(2): 669-84.

Lepage OM, Hartmann D, Eicher R, Uebelhart B, Tschudi P, Uebelhart D (1998). Biochemical markers of bone metabolism in draught and warmblood horses.
Vet J 156: 169-75.

Lepage OM, Carstanjen B, Uebelhart D (2001). Non-invasive assessment of equine bone: an update. Vet J 161(1): 10-22.

Lentz DE, Madsen FC, Miller JK, Hansard SL (1976). Effect of potassium and hypomagnesemia on insulin in the bovine. J Anim Sci 43: 1082-7.

Liesegang A, Sassi ML, Risteli J, Eicher R, Wanner M, Riond JL (1998). Comparison of bone resorption markers during hypocalcemia in dairy cows. J Dairy Sci 81: 2614-22.

Liesegang A, Eicher R, Sassi ML, et al. (2000). Biochemical markers of bone formation and resorption around parturition and during lactation in dairy cows with high and low standard milk yields. J Dairy Sci 83: 1773-81.

Lips P (2006). Vitamin D physiology. Prog Biophys Mol Biol 92(1): 4-8.

Littledike ET, Horst RL (1980). Problems with vitamin D injections for prevention of milk fever: toxicity of large doses and increased incidence of small doses. J Dairy Sci 63: 89.

Littledike ET, Horst RL (1982). Vitamin D3 toxicity in dairy cows. J Dairy Sci 65(5): 749-59.

Littledike ET, Goff J (1987). Interactions of calcium, phosphorus, magnesium and vitamin D that influence their status in domestic meat animals. J Anim Sci 65: 1727-43.

Liu BY, Guo J, Lanske B, Divieti P, Kronenberg HM, Bringhurst FR (1998). Conditionally immortalized murine bone marrow stromal cells mediate parathyroid hormone-dependent osteoclastogenesis in vitro. Endocrinology 139(4): 1952-64.

Lovšin Barle E (2004). Estrogeni receptorji. Vet Nov 30(11/12): 379-86.

Manolagas SC, Jilka RL, Girasole G, Passeri G, Bellido T (1993). Estrogen, cytokines, and the control of osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo. Osteoporos Int Suppl 1: 114-6.

Martens H, Käsebieter H (1983). In vitro studies of the effect of sodium and potassium ions on magnesium transport across the isolated rumen mucosa of sheep. Zentralbl Veterinarmed A 30(1): 1-14.

Martens H, Gabel G, Strozyk H (1987). The effect of potassium and the transmural potential difference on magnesium transport across an isolated preparation of sheep rumen epithelium. Q J Exp Physiol 72: 181-8.

Martens H, Heggemann G, Regier K (1988). Studies on the effect of K, Na, NH4+, VFA and CO2 on the net absorption of magnesium from the temporarily isolated rumen of heifers. Zentralbl Veterinarmed A 35: 73-80.

Martens H, Schweigel M (2000). Pathophysiology of grass tetany and other hypomagnesemias: implications for clinical management. Vet Clin North Am Food Anim Pract 16: 339-68.

Martens H, Schweigel M (2003). Influence of potassium on Mg- and Ca-metabolism in cows: effects and side-effects of research. Schweiz Arch Tierheilkd 145: 577-83.

Massey CD, Wang C, Donovan GA, Beede DK (1993). Hypocalcemia at parturition as a risk factor for left displacement of the abomasum in dairy cows. J Am Vet Med Assoc 203(6): 852-3.

Matsuo K, Irie N (2008). Osteoclast-osteoblast communication. Arch Biochem Biophys 473: 201-9.

McCoy MA, Goodall EA, Kennedy DG (1996). Incidence of bovine hypomagnesaemia in Northern Ireland and methods of magnesium supplementation. Vet Rec 138: 41-3.

Mello JRB (2003). Calcinosis--calcinogenic plants. Toxicon 41: 1-12.

Mendelson CR, MacDonald PC, Johnston JM (1980). Estrogen binding in human fetal lung tissue cytosol. Endocrinology 106(1): 368-74.

Meyer H, Busse FW (1975). Rectal absorption of magnesium in ruminants: brief report. Dtsch Tierarztl Wochenschr 82: 140-1.

Miller JK, Madsen FC, Lentz DE et al. (1980). Blood plasma magnesium, potassium, glucose, and immunoreactive insulin changes in cows moved abruptly from barn feeding to early spring pasture. J Dairy Sci 63: 1073-9.

Minkin C (1982). Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. Calcif Tissue Int 34(3): 285-90.

Morse D, Head HH, Wilcox CJ (1992). Disappearance of phosphorus in phytate from concentrates in vitro and from rations fed to lactating dairy cows. J Dairy Sci 75(7): 1979-86.

Mosel MV, Corlett SC (1990). Assessment of bone turnover in the dry period of dairy cows by measurement of plasma bone GLA protein, total plasma alkaline phosphatase activity and urinary hydroxyproline. Exp Physiol 75: 827-37.

Moseley G, Jones DI (1974). The effect of sodium chloride supplementation on the mineral nutrition in sheep. Proc Nutr Soc 33: 87A-8A.

Mulligan FJ, O'Grady L, Rice DA, Doherty ML (2006). A herd health approach to dairy cow nutrition and production diseases of the transition cow. Anim Reprod Sci 96(3/4): 331-53.

Murry AC, Lewis RD, Amos HE (1997). The effect of microbial phytase in a pearl millet-soybean meal diet on apparent digestibility and retention of nutrients, serum mineral concentration, and bone mineral density of nursery pigs. J Anim Sci 75: 1284-91.

Murray RD, Horsfield JE, McCormick WD, Williams HJ, Ward D (2008). Historical and current perspectives on the treatment, control and pathogenesis of milk fever in dairy cattle Vet Rec 163: 561-5.

Naito Y, Shindo N, Sato R, Murakami D (1990). Plasma osteocalcin in preparturient and postparturient cows: correlation with plasma 1,25-dihydroxyvitamin D, calcium, and inorganic phosphorus. J Dairy Sci 73: 3481-4.

Nakashima T, Takayanagi H (2008). The dynamic interplay between osteoclasts and the immune system. Arch Biochem Biophys 473: 166-71.

Norris SA, Pettifor JM, Gray DA, Buffenstein R (2001). Calcium metabolism and bone mass in female rabbits during skeletal maturation: effects of dietary calcium intake. Bone 29(1): 62-9.

National research council (2001). Nutrient requirements of dairy cattle. 7th ed. Washington: National Academy Press, 258-80.

Oetzel GR (1988). Parturient paresis and hypocalcemia in ruminant livestock. Vet Clin North Am Food Anim Pract 4: 351-64.

Oetzel GR, Fettman MJ, Hamar DW, Olson JD (1991). Screening of anionic salts for palatability, effects on acid-base status, and urinary calcium excretion in dairy cows. J Dairy Sci 74(3): 965-71.

Oetzel GR (1993). Use of anionic salts for prevention of milk fever in dairy cattle. Compend Cont Educ Pract Vet 15(8): 1138-46.

Oetzel GR (2000). Management of dry cows for the prevention of milk fever and other mineral disorders. Vet Clin North Am Food Anim Pract 16: 369-86.

Oetzel GR (2004). Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. Vet Clin North Am Food Anim Pract 20(3): 651-74.

Okura N, Yamagishi N, Naito Y, Kanno K, Koiwa M (2004). Technical note: vaginal absorption of 1,25(OH)2D3 in cattle. J Dairy Sci 87(8): 2416-9.

Olney RC (2009). Mechanisms of impaired growth: effect of steroids on bone and cartilage. Horm Res 72 (Suppl 1): 30-5.

Oreffo RO, Driessens FC, Planell JA, Triffitt JT (1998). Growth and differentiation of human bone marrow osteoprogenitors on novel calcium phosphate cements. Biomaterials 19(20): 1845-54.

Osredkar J, Marc J (1996). Vitamin D in presnovki: fiziologija, patofiziologija in referenčne vrednosti. Med Razgl 35: 543-65.

Ostergaard S, Gröhn YT (1999). Effects of diseases on test day milk yield and body weight of dairy cows from Danish research herds. J Dairy Sci 82(6): 1188-201.

Patel OV, Takenouchi N, Takahashi T, Hirako M, Sasaki N, Domeki I (1999). Plasma oestrone and oestradiol concentrations throughout gestation in cattle: relationship to stage of gestation and fetal number. Res Vet Sci 66: 129-33.

Peter AT, Bosu WT, MacWilliams P, Gallagher S (1987). Peripartal changes in serum alkaline phosphatase activity and lactate dehydrogenase activity in dairy cows. Can J Vet Res 51(4): 521–4.

Peterson RG, Waldern DE (1981). Repeatabilities of serum constituents in Holstein-Friesians affected by feeding, age, lactation, and pregnancy. J Dairy Sci 64(5): 822-31.

Philipov JP (1992). Changes in some biochemical indicators of bone turnover after ultraviolet irradiation of dairy cows. Res Vet Sci 53(3): 397-8.

Philipov JP (1995). Diagnostic value of some non-invasive methods for detecting subclinical forms of metabolic osteopathies in cattle. Rev Med Vet 146: 49-52.

Philipov JP (1996). Comparative investigation of blood biochemical parameters in metabolic and inflammatory bone diseases of cows. Vet Arh 66: 123-7.

Price JS, Jackson B, Eastell R et al. (1995a). Age related changes in biochemical markers of bone metabolism in horses. Equine Vet J 27: 201-7.

Price JS, Jackson B, Eastell R et al. (1995b). The response of the skeleton to physical training: a biochemical study in horses. Bone 17: 221-7.

Pyorala E, Pyorala S, Mero M, Adlercreutz H (1992). Oestrogens and milk fever--is there a link? Acta Vet Scand 33: 335-9.

Rabinowitz L, Sarason RL, Tanasovich C, Mendel VE, Brockman RP (1984). Effects of glucagon, insulin, propionate, acetate, and HCO3 on K excretion in sheep. Am J Physiol 246: R197-204.

Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD (2007). Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 10th ed. Edinburgh: Saunders-Elsievier, 1626-50.

Rajala-Schultz PJ, Grohn YT, Mcculloch CE (1999). Effects of milk fever, ketosis and lameness on milk yeald in dairy cows. J Dairy Sci 82(2): 288-94.

Ramberg CF Jr, Mayer GP, Kronfeld DS, Potts JT Jr (1976). Dietary calcium, calcium kinetics and plasma parathyroid hormone concentration in cows. J Nutr 106: 671-9.

Ramberg CF Jr, Johnson EK, Fargo RD, Kronfeld DS (1984). Calcium homeostasis in cows, with special reference to parturient hypocalcemia. Am J Physiol 246: R698-R704.

Rattanakul C, Lenbury Y, Krishnamara N, Wollkind DJ (2003). Modeling of bone formation and resorption mediated by parathyroid hormone: response to estrogen/PTH therapy. Biosystems 70: 55-72.

Reinhardt TA, Conrad HR (1980). Mode of action of pharmacological doses of cholecalciferol during parturient hypocalcemia in dairy cows. J Nutr 110: 1589-96.

Reinhardt TA, Hustmyer FG (1987). Role of vitamin D in the immune system. J Dairy Sci 70: 952-62.

Reinhardt TA, Horst RL, Goff JP (1988). Calcium, phosphorus, and magnesium homeostasis in ruminants. Vet Clin North Am Food Anim Pract 4: 331-50.

Rhoads ML, Rhoads RP, VanBaale MJ, Collier RJ, Sanders SR, Weber WJ, Crooker BA, Baumgard LH (2009). Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. J Dairy Sci 92(5): 1986-97.

Rickard DJ, Subramaniam M, Spelsberg TC (1999). Molecular and cellular mechanisms of estrogen action on the skeleton. J Cell Biochem 75 (Suppl 32/33): 123-32.

Riggs BL, Jowsey J, Kelly PJ, Hoffman DL, Arnaud CD (1976). Effects of oral therapy with calcium and vitamin D in primary osteoporosis. J Clin Endocrinol Metab 42: 1139-44.

Riggs BL, Khosla S, Melton LJ 3rd (2002). Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. Endocr Rev 23(3): 279-302.

Riond JL, Kocabagli N, Spichiger UE, Wanner M (1995). The concentration of ionized magnesium in serum during the periparturient period of non-paretic dairy cows. Vet Res Commun 19: 195-203.

Riond JL (2001). Animal nutrition and acid-base balance. Eur J Nutr 40(5): 245-54.

Risco CA, Reynolds JP, Hird D (1984). Uterine prolapse and hypocalcemia in dairy cows. J Am Vet Med Assoc 185(12): 1517-9.

Rizzo A, Minoia G, Ceci E, et al. (2008). The effect of calcium-naloxone treatment on blood calcium, β-endorphin, and acetylcholine in milk fever. J Dairy Sci 91: 3454-8.

Roche JR, Morton J, Kolver ES (2002). Sulfur and chlorine play a non-acid base role in periparturient calcium homeostasis. J Dairy Sci 85(12): 3444-53.

Roche JR, Berry DP (2006). Periparturient climatic, animal, and management factors influencing the incidence of milk fever in grazing systems. J Dairy Sci 89(7): 2775-83.

Rosenberger G (1970). Krankheiten des Rindes. Berlin: Paul Parey, 985-1046.

Rosol TJ, Capen CC (1997). Calcium-regulating hormones and dieseases of abnormal mineral (calcium, phosphorus, magnesium) metabolism. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, eds. Clinical biochemistry of domestic animals. 5. ed. San Diego: Academic Press, 619-702.

Rude RK (1998). Magnesium deficiency: a cause of heterogeneous disease in humans. J Bone Miner Res 13(4): 749-58.

Rude RK, Gruber HE, Norton HJ, Wei LY, Frausto A, Mills BG (2004). Bone loss induced by dietary magnesium reduction to 10 % of the nutrient requirement in rats is associated with increased release of substance P and tumor necrosis factor- alpha. J Nutr 134: 79-85.

Sachs M, Perlman R, Bar A (1987). Use of 1α-hydroxycholecalciferol in the prevention of bovine parturient paresis. IX. Early and late effects of a single injection. J Dairy Sci 70: 1671-5.

Sanchez WK, McGuire MA, Beede DK (1994). Macromineral nutrition by heat stress interactions in dairy cattle: review and original research. J Dairy Sci 77(7): 2051-79.

Sasser RG, Falk DE, Ross RH (1979). Estrogen in plasma of parturient paretic and normal cows. J Dairy Sci 62(4): 551-6.

Sato J, Okada K, Fukuda S, Sato R, Yasuda J, Naito Y (2002). Serum activities of tartrate-resistant acid phosphatase and bone specific alkaline phosphatase as indices of bone metabolism in the cow. J Vet Med Sci 64(7): 653-5.

Sato J, Kanata M, Yasuda J, Sato R, Okada K, Seimiya Y, Naito Y (2005). Changes of serum alkaline phosphatase activity in dry and lactational cows. J Vet Med Sci 67(8): 813-5.

Schweigel M, Vormann J, Martens H (2000). Mechanisms of Mg2+ transport in cultured ruminal epithelial cells. Am J Physiol 278: G400-8.

Sciorsci RL, Dell'Aquila ME, Minoia P (2001). Effects of naloxone on calcium turnover in cows affected by milk fever. J Dairy Sci 84(7): 1627-31.

Scutt A, Bertram P (1995). Bone marrow cells are targets for the anabolic actions of prostaglandin E2 on bone: induction of a transition from nonadherent to adherent osteoblast precursors. J Bone Miner Res 10(3): 474-87.

Sechen SJ, Bmerel RD, Jorgensen NA (1988). Prolactin, estradiol, and progesterone changes in paretic and nonparetic cows during the periparturient period. Am J Vet Res 49(3): 411-6.

Seifi HA, Mohri M, Kalamati Zadeh J (2004). Use of pre-partum urine pH to predict the risk of milk fever in dairy cows. Vet J 167(3): 281-5.

Serra R, Karaplis A, Sohn P (1999). Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)-dependent and -independent effects of transforming growth factor beta (TGF-beta) on endochondral bone formation. J Cell Biol 145(4): 783-94.

Sigrist IM, Gerhard C, Alini M, Schneider E, Egermann M (2007). The long-term effect of ovariectomy on bone metabolism in sheep. J Bone Miner Metab 25: 28-35.

Smith BP (2002). Large animal internal medicine. 3rd ed. St. Louis: Mosby, 1247-60.

Starič J, Ježek J, Klinkon M, Nemec M, Zadnik T (2008). Bone tissue metabolism in cattle. *Acta agric Slov* (Suppl. 2): 163-6.

Swaminathan R (2001). Biochemical markers of bone turnover.
Clin Chimica Acta 313: 95-105.

Syed F, Khosla S (2005). Mechanisms of sex steroid effects on bone.
Biochem Biophys Res Commun 328: 688-96.

Takeda S, Yoshizawa T, Nagai Y, et al. (1999). Stimulation of osteoclast formation by 1,25-dihydroxyvitamin D requires its binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic cells: studies using VDR knockout mice. Endocrinology 140(2): 1005-8.

Taylor MS, Knowlton KF, McGilliard ML,Seymour WM, Herbein JH (2008). Blood mineral, hormone, and osteocalcin responses of multiparous jersey cows to an oral dose of 25-hydroxyvitamin D3 or vitamin D3 before parturition. J Dairy Sci 91: 2408–16.

Taylor MS, Knowlton KF, McGilliard, et al. (2009). Dietary calcium has little effect on mineral balance and bone mineral metabolism through twenty weeks of lactation in Holstein cows. J Dairy Sci 92: 223–37.

Ternouth JH, Coates DB (1997). Phosphorus homeostasis in grazing breeder cattle.
J Agric Sci 128: 331-7.

Thilsing-Hansen T, Jørgensen RJ, Enemark JM, Zelvyte R, Sederevicius A (2003). The effect of zeolite A supplementation in the dry period on blood mineral status around calving.
Acta Vet Scand Suppl. 97: 87-95.

Tomas FM (1973). Parotid salivary secretion in sheep: its measurement and influence on phosphorus in rumen fluid. Q J Exp Physiol Cogn Med Sci 58: 131-8.

Tomas FM, Potter BJ (1976). The site of magnesium absorption from the ruminant stomach.
Br J Nutr 36: 37-45.

Turner AS (2007). Seasonal changes in bone metabolism in sheep: further characterization of an animal model for human osteoporosis. Vet J 174(3): 460-1.

Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, et al. (1999). Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand. Bone 25(5): 517-23.

Underwood EJ, Suttle NF (1999). The mineral nutrition of livestock. Wallingford: CABI Publishing, 67-184.

Vagg MJ, Payne JM (1970). The effect of ammonium chloride induced acidosis on calcium metabolism in ruminants. Br Vet J 126: 531–6.

Valk H, Beynen AC (2003). Proposal for the assessment of phosphorus requirements of dairy cows. Livest Prod Sci 79: 267-72.

Waldron MR, Nonnecke BJ, Nishida T, Horst RL, Overton TR (2003). Effect of lipopolysaccharide infusion on serum macromineral and vitamin D concentrations in dairy cows. J Dairy Sci 86: 3440-6.

Walker GM (1986). Magnesium and cell cycle control: an update. Magnesium 5: 9-23.

Wasserman RH, Armbrecht HJ, Shimura F, Meyer S, Chandler JS (1984). Vitamin D influences multiple phases of the intestinal calcium transport system.
Prog Clin Biol Res 168: 307-12.

Wasserman RH, Fullmer CS (1995). Vitamin D and intestinal calcium transport: facts, speculations and hypotheses. J Nutr 125 (Suppl 7): 1971S-9S.

Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC (1998). Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. J Clin Invest 102(2): 274-82.

Weiss J (1993). Calcium and phosphorus supply of dairy cows: new knowledge requires new strategies. Milch-Praxis 31(4): 213-217.

West JW (2003). Effects of heat-stress on production in dairy cattle.
J Dairy Sci 86(6): 2131-44.

Wheelock JB, Rhoads RP, Vanbaale MJ, Sanders SR, Baumgard LH (2010). Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. J Dairy Sci 93(2): 644-55.

Whitaker DA, Kelly JM, Smith EJ (1985). Hypomagnesaemia increase. Vet Rec 116: 451-2.

Whitaker DA (1997). Interpretation of metabolic profiles in dairy cows.
Irish Vet J 50(8): 498-501.

Wilson GF (2003). A new practical method to prevent hypocalcaemia in dairy cows at pasture. Acta Vet Scand Suppl 98: 244.

Woitge HW, Scheidt-Nave C, Kissling C et al. (1998). Seasonal variation of biochemical indexes of bone turnover: results of a population-based study.
J Clin Endocrinol Metab 83: 68-75.

Yamagishi N, Ayukawa Y, Lee I, Oboshi K, Naito Y (2005). Calcium metabolism in cows receiving an intramuscular injection of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 combined with prostaglandin $F_{2\alpha}$ closely before parturition. J Vet Sci 6(2): 165-7.

Zadnik T, Soršak B, Klinkon M, Starič J (2008). Duphafral® vit. D_3 1000 and KatAn® anionic salts for the prevention of milk fever in dairy cows. Acta Vet Bg 58(2-3): 241-57.

Zwerina J, Tuerk B, Redlich K, Smolen JS, Schett G (2005). Imbalance of local bone metabolism in inflammatory arthritis and its reversal upon tumor necrosis factor blockade: direct analysis of bone turnover in murine arthritis. Arthritis Res Ther 8: R22.

11 PRILOGE

Tabela 40: Izmerjene vrednosti vseh biokemijskih parametrov pri posameznih kravah

Zap. št.	Ušesna št.	Skupina	Obdobje	Ca1	Ca2	Ca3	Ca4	aP1	aP2	aP3	aP4	Mg1	Mg2	Mg3	Mg4	ALP1	ALP2	ALP3	ALP4	bALP1	bALP2	bALP3	bALP4	CTx1	CTx2	CTx3	CTx4	estradiol1	estradiol2	estradiol3	estradiol4
1	7404	3	1	2,49	2,26	0,95	2,30	1,86	1,99	0,37	1,85	1,10	0,93	1,19	0,89	47	36	57	34	9,90	18,67	13,80	31,20	0,011	0,159	0,240	2,040	0,191	1,135	0,180	0,070
2	7247	1	1	2,52	2,49	2,26	2,47	2,18	2,04	1,04	1,84	0,92	1,02	1,24	1,02	37	33	46	41	9,80	17,20	27,90	35,00	0,060	0,215	0,972	1,430	0,113	0,636	0,701	0,070
3	2301	1	1	2,47	2,35	1,82	2,32	1,97	2,02	1,58	2,03	0,92	0,90	1,04	0,93	27	44	42	26	10,20	15,89	26,70	20,40	0,011	0,120	0,350	1,050	0,312	0,987	0,105	0,098
4	7238	1	1	2,38	2,49	1,25	2,52	1,33	1,74	1,19	1,69	0,93	0,97	1,34	1,00	31	37	54	38	12,80	11,80	16,10	32,10	0,170	0,040	0,275	1,820	0,288	0,452	0,220	0,178
5	7308	3	1	2,58	2,51	1,15	2,44	1,72	1,88	1,20	1,35	0,88	0,90	1,00	0,53	59	59	68	63	12,00	11,30	19,90	28,20	0,011	0,011	0,440	0,404	0,280	0,422	0,135	0,095
6	7447	1	1	2,41	2,33	2,17	2,20	1,77	2,69	2,39	2,06	0,97	0,95	0,86	0,83	47	59	68	37	15,90	16,00	26,80	30,10	0,138	0,170	0,480	1,700	0,390	1,390	0,701	0,171
7	2365	1	1	2,60	2,35	1,94	2,34	2,38	2,02	1,77	1,91	1,02	0,90	1,02	0,99	25	44	52	37	22,30	15,89	28,41	28,85	0,178	0,120	0,740	1,228	0,351	0,987	0,118	0,082
8	7298	1	1	2,65	2,38	2,21	2,17	2,07	1,88	1,43	1,73	0,91	0,78	0,74	0,70	54	59	63	40	12,70	17,30	41,20	30,20	0,046	0,193	1,300	0,563	0,237	0,404	0,070	0,087
9	7202	3	1	2,52	2,39	0,88	2,08	2,36	1,91	1,05	1,70	0,94	1,00	1,55	0,74	32	36	51	60	13,00	10,30	15,90	47,80	0,014	0,071	0,227	1,370	0,263	0,727	0,382	0,143
10	7376	1	1	2,43	2,25	2,35	2,46	1,93	1,61	2,39	1,82	0,98	1,04	0,98	0,97	29	42	68	29	12,30	30,60	26,80	22,10	0,146	0,190	0,743	1,390	0,390	3,460	0,900	0,077
11	7262	3	1	2,49	2,39	1,28	2,35	2,27	2,29	0,91	2,26	0,81	0,86	1,28	0,88	33	32	33	33	10,00	8,30	28,10	23,10	0,250	0,088	0,739	0,840	0,154	0,378	0,129	0,110
12	7371	1	1	2,53	2,41	1,81	2,42	1,80	1,88	1,80	1,61	0,71	0,90	1,04	0,80	65	53	49	50	11,00	3,80	24,20	30,40	0,071	0,095	0,246	0,543	0,289	0,822	0,109	0,070
13	7496	1	1	2,27	2,14	2,00	2,39	2,04	2,40	2,59	2,11	0,81	0,73	0,84	0,70	68	79	96	66	5,80	31,60	55,30	40,40	0,026	0,656	1,230	1,400	0,277	1,360	0,094	0,077
14	7261	1	1	2,71	2,44	1,94	2,17	2,96	2,05	1,69	1,95	0,82	0,78	0,86	0,89	30	31	37	30	14,20	13,10	14,70	27,30	0,110	0,011	0,116	0,323	0,082	1,390	0,700	0,070
15	7441	1	1	2,55	2,21	1,94	2,40	1,78	1,19	1,46	2,09	1,04	1,00	1,13	1,04	23	25	38	20	14,10	20,70	24,20	18,00	0,051	0,355	0,742	1,520	0,154	2,920	0,700	0,070
16	7460	1	1	2,45	2,37	1,78	2,28	1,89	2,20	1,24	1,96	1,00	1,02	1,09	1,05	40	43	47	39	13,00	12,20	29,30	33,10	0,072	0,120	1,500	1,310	0,176	0,987	0,127	0,105
17	7360	1	1	2,43	2,38	2,06	2,28	1,94	2,08	2,44	2,62	0,92	0,74	0,78	0,78	34	36	35	35	12,20	15,00	17,10	30,10	0,067	0,082	0,259	0,603	0,123	1,580	0,098	0,070
18	7408	3	1	2,44	1,91	0,89	2,21	2,11	1,39	0,87	1,58	0,95	1,46	1,22	0,82	48	59	51	44	11,10	31,70	17,70	32,20	0,076	0,093	0,262	1,250	0,156	2,820	0,091	0,089
19	7341	1	1	2,48	2,35	2,03	2,33	1,92	2,26	1,55	1,54	0,98	0,88	1,01	0,91	44	50	62	44	11,50	8,70	42,30	33,90	0,080	0,027	0,764	1,340	0,130	0,683	0,098	0,107
20	7409	3	1	2,37	2,07	1,88	2,10	1,66	2,08	1,32	1,87	0,92	0,93	1,03	0,93	31	36	47	26	6,20	19,80	22,10	21,10	0,340	0,087	0,229	1,260	0,151	0,606	0,526	0,077
21	7438	1	1	2,30	2,36	1,52	2,37	1,71	2,15	1,99	1,76	0,96	0,84	1,40	0,92	24	25	27	21	14,20	8,80	25,10	18,00	0,120	0,053	0,886	2,300	0,128	0,291	0,090	0,088
1	7428	2	0	2,37	2,37	1,88	2,28	2,58	1,91	1,60	1,65	1,15	1,05	1,42	1,20	71	88	54	35	13,60	28,80	26,00	32,00	0,139	0,185	0,490	1,880	0,278	0,280	0,180	0,123
2	7295	4	0	2,34	2,28	2,08	2,33	2,10	2,28	1,37	1,88	0,90	0,89	0,94	0,93	48	49	75	36	14,40	14,40	38,30	25,80	0,210	0,220	1,150	4,670	0,218	0,802	0,108	0,133
3	2340	2	0	2,33	2,14	2,05	2,28	2,00	2,19	2,43	2,01	1,00	0,87	1,02	0,90	50	44	47	37	12,60	25,30	27,20	27,10	0,172	0,150	0,270	1,500	0,230	0,694	0,114	0,128
4	2428	3	0	2,33	2,37	1,44	2,17	2,28	2,38	1,39	2,27	0,86	0,83	0,97	0,92	39	52	40	38	22,80	34,20	37,30	29,90	0,216	0,186	1,280	3,130	0,345	1,580	0,081	0,127
5	7328	4	0	2,14	2,40	2,34	2,41	1,90	2,17	2,81	2,13	0,79	0,87	0,99	0,84	28	31	36	23	12,20	10,10	16,00	18,20	0,324	0,750	0,790	1,870	0,415	1,570	0,173	0,100
6	7320	3	0	2,34	2,26	0,57	2,23	2,67	2,23	0,43	2,23	0,73	0,92	0,98	0,91	23	29	54	37	11,70	14,10	39,40	24,40	0,091	0,230	0,250	0,570	0,285	0,995	0,393	0,124
7	4813	4	0	2,34	2,28	1,78	2,16	2,98	2,15	1,64	2,98	0,88	0,80	0,91	0,95	29	31	45	60	11,60	8,10	26,20	38,00	0,149	0,110	0,242	0,925	0,199	0,664	0,197	0,123
8	2339	3	0	2,44	2,23	1,59	2,29	2,46	1,92	1,24	2,03	1,03	1,08	1,04	0,82	32	30	36	25	13,60	14,80	26,20	19,10	0,080	0,291	1,040	0,856	0,175	0,680	0,160	0,125
9	7437	4	0	2,31	2,34	1,87	2,19	2,23	1,89	1,37	2,03	0,80	1,04	1,10	1,00	35	39	56	25	10,40	17,00	36,00	20,20	0,423	0,232	0,810	2,950	0,300	1,770	0,186	0,102
10	7114	2	0	2,42	2,38	1,81	2,29	2,00	1,88	2,08	2,10	1,00	1,09	1,25	0,98	35	37	51	38	12,40	26,00	44,40	24,38	0,172	0,111	0,980	0,691	0,142	1,340	0,140	0,120
11	2427	4	0	2,30	2,43	2,21	2,52	2,28	2,53	1,90	1,87	0,96	1,05	0,93	0,78	82	64	48	34	29,20	12,00	30,40	25,20	0,267	0,130	0,845	0,654	0,156	0,657	0,181	0,105
12	2321	2	0	2,28	2,27	2,02	2,12	1,88	2,03	2,47	2,16	0,93	0,97	1,08	0,97	47	51	77	39	19,00	4,40	45,20	18,90	0,350	0,107	0,754	2,810	0,359	0,789	0,285	0,222
13	7291	2	0	2,04	1,86	1,93	2,20	2,52	1,62	1,47	3,00	0,94	0,96	0,90	1,15	65	78	52	71	16,00	18,10	43,20	32,20	0,784	0,238	0,976	1,250	0,294	0,591	0,686	0,142
14	7362	3	0	2,47	2,22	1,56	2,27	2,05	1,85	0,93	1,96	0,92	0,75	1,05	0,85	43	38	46	37	15,20	28,00	30,20	15,80	0,170	0,191	0,320	1,180	0,120	1,670	0,348	0,102
15	4647	4	0	2,48	2,23	2,20	2,50	2,18	2,10	2,20	2,71	1,00	0,97	1,02	0,86	29	30	37	29	14,10	16,10	29,10	28,20	0,190	0,222	0,770	2,480	0,160	1,310	0,179	0,124
16	2338	4	0	2,47	2,31	1,98	2,46	2,12	1,44	1,66	1,67	1,09	0,85	0,77	0,85	33	42	42	40	12,10	26,20	29,10	33,10	0,080	0,260	0,410	6,480	0,150	3,070	0,101	0,082
17	2423	4	0	2,17	2,24	1,32	2,21	1,88	2,33	1,41	1,84	0,95	0,92	1,01	0,84	35	49	112	66	15,40	27,30	32,80	33,80	0,220	0,191	0,010	0,873	0,238	0,819	6,630	0,210
18	7143	3	0	2,20	2,22	0,92	2,37	2,14	1,97	0,38	2,05	0,97	0,91	0,78	1,05	29	34	42	29	14,20	26,40	26,10	23,10	0,044	0,295	0,218	0,620	0,150	2,540	0,136	0,101
19	4673	3	0	2,23	2,31	0,95	2,27	1,74	1,87	0,42	1,64	0,97	1,01	1,21	0,69	47	48	78	40	12,80	20,80	29,40	23,10	0,114	0,170	0,750	0,641	0,141	0,789	0,686	0,330
20	7392	4	0	2,24	2,27	2,34	2,36	1,62	2,10	2,58	1,28	1,11	1,05	0,76	0,93	32	39	61	34	14,00	11,60	15,10	24,20	0,159	0,061	0,175	0,591	0,156	1,510	0,157	0,144
21	7449	4	0	2,25	2,17	1,99	2,28	2,04	1,60	1,60	1,97	0,99	0,74	0,84	0,75	26	41	40	26	7,20	7,33	20,60	23,40	0,184	0,064	0,305	0,573	0,216	5,300	0,174	0,141
22	2433	2	0	2,21	2,33	2,23	2,23	1,90	1,69	2,43	2,61	0,94	0,94	0,99	1,04	42	34	42	22	17,60	7,36	27,00	18,80	0,209	0,083	0,714	0,490	0,164	0,868	0,140	0,115
23	2332	4	0	2,18	2,30	1,38	2,26	2,12	2,53	1,94	3,03	1,03	0,86	0,81	0,96	25	36	36	25	16,10	25,10	24,80	22,90	0,268	0,077	0,435	0,845	0,157	2,970	0,334	0,102
24	7355	3	0	2,18	2,25	1,24	2,03	1,85	1,89	0,77	2,14	0,91	0,93	1,20	0,79	32	36	69	44	20,10	18,67	33,10	30,20	0,225	0,159	0,985	2,020	0,153	1,135	0,686	0,127
25	7336	3	0	2,22	2,17	1,17	1,74	2,08	2,13	1,75	1,29	0,88	0,97	1,54	0,54	26	29	34	32	12,20	13,30	33,60	28,10	0,275	0,192	0,770	1,060	0,165	0,418	0,237	0,199
26	7165	2	0	2,38	1,86	2,04	2,29	2,23	0,90	1,71	2,10	0,96	1,34	0,98	0,98	124	129	55	38	12,20	13,60	32,33	24,38	0,133	0,046	0,627	0,691	0,422	2,327	0,138	0,120
28	2467	3	0	2,43	2,43	2,19	2,55	1,98	2,49	1,48	2,10	1,03	0,89	0,96	1,04	37	44	55	31	26,00	14,80	35,00	24,10	0,398	0,139	0,770	1,770	0,286	1,040	0,635	0,104
29	2465	4	0	2,21	2,38	2,23	2,22	2,03	2,85	2,23	1,93	0,98	0,78	0,93	0,96	56	62	97	33	24,00	8,50	19,40	25,40	0,327	0,095	0,188	0,581	0,157	0,760	0,389	0,070
30	2433	4	0	2,15	2,46	1,64	2,35	1,99	2,33	1,45	1,85	0,75	0,88	1,00	0,80	31	35	39	27	15,80	7,35	19,20	24,80	0,182	0,019	0,300	0,677	0,156	0,585	0,126	0,107
31	7425	2	0	2,37	2,39	1,73	2,21	1,88	2,04	1,63	1,91	1,16	0,87	1,10	0,84	38	46	55	39	16,10	7,30	23,40	28,00	0,109	0,021	0,461	0,839	0,199	0,742	0,109	0,130
32	4490	2	0	2,30	2,35	2,04	2,29	2,54	1,93	0,72	2,01	1,13	0,87	0,98	1,02	28	41	37	27	13,10	7,70	29,00	19,20	0,145	0,063	1,010	0,323	0,152	0,918	0,106	0,092
33	4316	2	0	2,47	2,32	2,38	2,29	1,90	1,93	1,08	1,31	1,05	0,87	0,88	0,78	27	52	81	54	17,90	12,00	28,60	16,20	0,372	0,086	0,427	0,690	0,165	2,910	0,070	0,070
34	4121	2	0	2,41	2,24	2,20	2,34	2,44	1,93	2,03	2,03	0,97	0,78	0,93	0,93	36	32	40	31	16,00	6,80	24,20	28,00	0,268	0,077	0,583	0,992	0,222	2,330	0,136	0,140
35	377	2	0	2,29	1,86	1,90	2,41	2,01	2,03	1,16	1,93	0,92	0,82	0,85	0,90	53	40	45	25	9,00	8,60	25,80	22,80	0,102	0,118	0,455	0,432	0,230	1,590	0,087	0,081
36	4189	2	0	2,17	2,25	2,16	2,12	2,00	1,98	1,71	2,16	0,87	0,76	0,92	0,99	52	35	42	39	8,00	12,10	18,80	24,80	0,080	0,112	0,261	0,438	0,450	0,587	0,118	0,093

Legenda: Skupina 1-poletna, 2-zimska, 3-PH, 4-vitamin D_3; Obdobje 1-poletno, 2-zimsko; Odvzemi so označeni z 1 do 4 ob merjenih parametrih