

UDK: 612.359: 636.2: 637.1

MORFOLOŠKO I FUNKCIONALNO STANJE ČELIJA JETRE KOD MLEČNIH KRAVA U RANOJ LAKTACIJI

RADOJICA ĐOKOVIĆ¹, HOREA ŠAMANC², JOVAN BOJKOVSKI²,
SUNČICA BOROZAN², SNEŽANA BOŠKOVIĆ-BOGOSAVLJEVIĆ¹

IZVOD: Cilj našeg istraživanja je bio a) da se odredi funkcionalno stanje jetre, određivanjem koncentracije glukoze, holesterola, ukupnog bilirubina, albumina i aktivnost aspartat-amino-transferaze (AST) u krvi kod krava u puerperalnom periodu; b) da se utvrdi povezanost između koncentracija ovih parametara krvi i patohistoloških promena tkiva jetre uzetih biopsijom kod krava u ranoj laktaciji. Za ispitivanje je odabrano 20 krava Holštajn-Frizijske rase, vezasnog sistema držanja, koje su prosečno imale tri laktacije sa prosečnom mlečnošću u prethodnoj laktaciji od 7625 litara. Krave smo pratili u periodu 3. do 7. dana nakon telenja i podeljene su u dve grupe i to: na grupu zdravih krava (n=10) i na grupu krava sa kliničkim znacima ketoze (n=10). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je kod krava obolelih od ketoze utvrđena masna infiltracija i degeneracija hepatocita srednjeg stepena (32,91±15,28% masti), a ove vrednosti su bile statistički značajno veće u odnosu na sadržaj masti u hepatocitima kod zdravih sveže oteljenih krava ($x=32,91$; $9,35$; $p<0,01$). Na osnovu naših rezultata smo ustanovili, da kod krava obolelih od ketoze je prisutna masna infiltracija i degeneracija čelija jetre srednjeg stepena. Hipoglikemija, hipoalbuminemia i hipoholesterolemija kod ketoznih krava, ukazuje na smanjenu sintetsku funkciju čelija jetre, a značajno povećane koncentracije ukupnog bilirubina i aktivnost AST u krvnom serumu kao i značajna pozitivna korelacija između aktivnosti AST i koncentracije bilirubina u krvi sa sadržajem masti u jetri, na narušen morfološki integritet čelija jetre kod krava obolelih od ketoze.

Ključne reči: mlečne krave, rana laktacije, jetra.

Originalni naučni rad / Original scientific paper

¹ Dr Radojica Đoković, docent, Dr Snežana Bošković-Bogosavljević, Agronomski fakultet Čačak.

² Dr Horea Šamanc, red.prof., Dr Jovan Bojkovski, vanr.prof., Dr Sunčica Borozan, vanr.prof. Fakultet veterinarske medicine, Beograd.

UVOD

Prisustvo prekomerne količine masti u jetri je čest nalaz kod krava za vreme kasnog graviditeta i rane laktacije. Kod mlečnih rasa krava, u periodu oko telenja, umerena masna infiltracija i degeneracija ćelija jetre se smatra skoro fiziološkim stanjem.

Metabolička stanja negativnog bilansa energije kod krava (gladovanje, porodaj i laktacija) dovode do ubrzane i nekontrolisane mobilizacije masti iz telesnih depoa i njihovog povećanog nakupljanja u jetri, narušavajući njen morfološki i funkcionalni integritet (Grohn 1985, Veenhuizen i sar. 1993, Gaal, 1993, Vazquez-anon i sar., 1994, Jorritsma, 2003; Šamanc, i sar., 2000; Djoković i sar., 2002).

Sadržaj masti u jetri krava u peripartalnom periodu, u zavisnosti od patološkog stanja, može iznositi od 10–60%. Prema podacima koje iznosi (Gaal, 1993, 2005) postoje tri stepena u razgraničavanju zamašćenosti jetre i to: blagi (do 20% masti), srednji (20–40%) i teški (preko 40%) stepen masne jetre.

Kod masne infiltracije i degeneracije ćelija jetre, narušava se funkcionalni integritet hepatocita, što za posledicu ima smanjivanje koncentracije nekih parametara krvi (glukoza, ukupni proteini, albumini, globulini, holesterol, trigliceridi, urea) koji se sintetišu u jetri. Takođe se smanjuje i ekskreciona uloga hepatocita pa su koncentracije pojedinih metaboličkih produkata jetre u krvi obično povećane, bilirubun, amonijak, žučne kiseline (Krdžalić i sar., 1982; Kauppinen, 1984; Jovanović i sar., 1993; Forenbacher i sar., 1993; Acorda i sar., 1995; Gaal, 2001; Andrews, 2004).

Koncentracija bilirubina u krvi kod krava se smatra jednim od indikatora funkcionalne sposobnosti hepatocita (Vasilev, 1979; Bobe, G., 2004).

Kod težeg stepena zamašćenja jetre i difuzne infiltracije hepatocita dolazi do oštećenja ćelijske membrane i razaranja hepatocita, a iz citoplazme se oslobadjaju enzimi (AST, SDH, GGT, ALT i GLDH) čija se aktivnost u krvi značajno povećava (Kauppinen, 1984; Jovanović i sar., 1993; Gaal, 2001).

S obzirom na značaj ovih podataka postavili smo za cilj rešavanje sledećih zadataka: a) da se odredi funkcionalno stanje jetre odredjivanjem koncentracije glukoze, holesterola ukupnog bilirubuna, albumina i aktivnost aspartat-amino-transferaze (AST) u krvi kod krava u puerperalnom periodu; b) da se utvrdi povezanost između koncentracija ovih parametara krvi i patohistoloških promena tkiva jetre uzetih biopsijom kod krava u ranoj laktaciji.

MATERIJAL I METOD RADA

Za ispitivanje je odabrano 20 krava Holštajn-Frizijske rase, vezasnog sistema držanja, koje su prosečno imale tri laktacije i sa prosečnom mlečnošću u prethodnoj laktaciji od 7625 litara. Krave smo pratili u periodu 3. do 7. dana nakon telenja i podeljene su u dve grupe i to: na grupu zdravih krava (n=10) i na grupu krava sa kliničkim znacima ketoze (n=10).

Klinički obolelim kravama smatrali smo one krave u čijoj mokraći su dijagnostikovana ketonska tela, u koncentracijama većim od 17,20 mmol/l, a pri tom za ispitivanja nisu uzimana u obzir grla kod kojih je ketonurija bila pratilac drugog osnovnog oboljenja, kao na primer, zaostajanje posteljice, mastitis i dr. Od svih ispitivanih krava uzimani su uzorci krvi punkcijom v. jugularis, od 10 do 12 časova pre podne, odnosno 4 do 6 časova po-

sle jutarnje muže i hranjenja. Odvajanje krvnog seruma posle spontane koagulacije vrše-no je na sobnoj temperaturi i centrifugovanjem na 3000 obrtaja /min. Serum je čuvan do ispitivanja na temperaturi od -18°C . Koncentracija glukoze je određivana u svežoj krvi enzimskom metodom specifičnom za glukozu (Dextrostix trake) na „Eyeton” refraktometru. Nivo holesterola, albumina, ukupnog bilirubina i aktivnost AST u krvnom serumu je određivan spektrofotometrijski upotrebom komercijalnih paketa (Dialab, Wien Austria). Uzorci tkiva jetre su uzimani odmah nakon uzimanja uzoraka tkiva krvi, metodom perkutane biopsije (Gaal-ova modifikovana metoda po Hajovsava-Kacifirex, 1967). Kriotomski iseći tkiva jetre fiksirani su u formalinu i bojeni su Sudan-3 metodom za masti. Step en zamašćenja ćelija jetre je određivan stereometrijskom metodom određivanjem volumenske gustine.

Na osnovu dobijenih rezultata su izračunate osnovne mere varijacije, a značajnost razlika između dobijenih srednjih vrednosti izračunata je pomoću T-testa.

REZULTATI ISPITIVANJA I DISKUSIJA

Rezultati ispitivanja koncentracija ($\bar{x}\pm\text{SD}$) glukoze, holesterola, ukupnog bilirubina, albumina i aktivnost aspartat-amino-transferaze (AST) u krvi i sadržaj masti u jetri kod zdravih i ketoznih krava prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Koncentracije glukoze, holesterola, ukupnog bilirubina, albumina i aktivnost aspartat-amino-transferaze (AST) u krvnom serumu zdravih i krava obolelih od ketoze

Table 1. Concentrations of the glucose (mmol/l), cholesterol (mmol/l) total bilirubina ($\mu\text{mol/l}$), albumin (g/l) and activity of aspartate amino-transferase (IU/l) in the blood serum and level of fatty liver (%) in healthy and ketotic cows

	Grupa / Group	
	zdrave krave / <i>healthy cows</i>	ketozne krave / <i>ketotic cows</i>
Glukoza / Glucose	2,71 \pm 0,35	1,8 \pm 0,43**
Holesterol / Cholesterol	1,86 \pm 0,62	1,39 \pm 0,29**
Bilirubin / Bilirubin	5,80 \pm 1,05	6,79 \pm 1,85**
Albumin / Albumin	34,39 \pm 2,70	31,73 \pm 3,15**
AST	92,80 \pm 29,5	131,6 \pm 58,05**
% masti u jetri Level of fatty liver	9,35 \pm 1,25	32,91 \pm 15,28**

** $p<0,01$.

Iz prikazanih rezultata može se videti da je kod krava obolelih od ketoze utvrđena masna infiltracija i degeneracija hepatocita srednjeg stepena (32,91 \pm 15,28% masti), a ove vrednosti su bile statistički značajno veće u odnosu na sadržaj masti u hepatocitima kod zdravih sveže oteljenih krava ($\bar{x}=32,91$; 9,35, $p<0,01$). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa podacima drugih autora (Husveth, 1982; Grohn, 1985; Veenhuizen i sar. 1991; Gaal 1993, 2001, Vazquez-Anon i sar., 1994; Nielsen i Ingvarsten, 2004), koji su kod krava obolelih od ketoze u prvim nedeljama laktacije utvrdili različite stepene masne infiltraci-

je i degeneracije ćelija jetre. Prema njihovom mišljenju pojačana i nekontrolisana lipomobilizacija iz telesnih depoa koja započinje još u visokom graviditetu, a maksimum dostiže na početku laktacije je glavni razlog za nastajanje ketoze i masne jetre mlečnih krava. Do određenog stepena, ovaj proces predstavlja fiziološki odgovor organizma na stanje negativnog bilansa enerije, što je slučaj na početku laktacije. Medjutim, kod životinja obolelih od ketoze se mobilišu značajno veće količine masti iz telesnih rezervi nego što su stvarne potrebe organizma, što može ukazati na odlučujuću ulogu masnih kiselina u prekomernom nakupljanju masti u hepatocitima i nastanku masne jetre kod mlečnih krava.

U našem radu kod krava koje su obolele od ketoze i kod kojih je ustanovljena masna infiltracija i degeneracija ćelija jetre u krvnom serumu su utvrđene značajne promene većine ispitivanih biohemijskih sastojaka krvi.

Iz prikazanih podataka može se videti da su kod ketoznih krava utvrđene statistički značajno manje vrednosti koncentracija glukoze (1,80: 2,71 mmol/l, $p < 0,01$), albumina (1,80: 2,71 mmol/l, $p < 0,01$) i holesterola (1,39 : 1,86 mmol /l $p < 0,01$) u krvi u odnosu na vrednosti ovih parametara kod zdravih krava.

Na osnovu našeg nalaza i podataka drugih autora, možemo konstatovati da kod krava sa "masnom" jetrom, dolazi do smanjivanja funkcionalne sposobnosti hepatocita u odvijanju neophodnih sintetskih metaboličkih procesa, što se nepovoljno odražava na metabolizam organskih materija u jetri (Krdžalić i sar., 1982; Grohn, 1985; Veenhuizen i sar., 1991; Jovanović i sar., 1993; Vazquez-anon i sar., 1994; Acorda i sar., 1995; Gaal, 2001).

Kod krava obolelih od ketoze utvrđene su statistički značajno veće koncentracije ukupnog bilirubina (6,79: 5,80 $\mu\text{m/l}$, $p < 0,01$) i aktivnosti AST u krvi (131,60: 92,80 IJ/l, $p < 0,01$) u odnosu na vrednosti u krvi kod zdravih krava.

Naši rezultati potvrđuju nalaze većeg broja autora (Vasilev, 1978; Kauppinen, 1984; Forenbacher, 1993; Jovanović i sar., 1993; Gaal, 1983, 1993, 2001) koji navode da kod krava sa "masnom" jetrom dolazi do oštećenja ćelija jetre, a kao posledica toga su skoro uvek povećane koncentracije bilirubina, kao i povećane aktivnosti enzima u krvi specifičnih za tkivo jetre.

Takođe, utvrđena je i značajna pozitivna korelacija između količine masti u hepatocitima i koncentracije bilirubina u krvi ($r=0,50$), kao i značajno pozitivna korelacija ($r=0,69$) između količine masti u jetri i aktivnosti AST-a u krvi, što nedvosmisleno ukazuje na oštećenje ekskretorne funkcije hepatocita, odnosno oštećenje ili razaranje membrane hepatocita i propuštanje bilirubina i endocelularnih enzima iz ćelija jetre u cirkulaciju.

ZAKLJUČAK

Kod krava obolelih od ketoze je prisutna masna infiltracija i degeneracija ćelija jetre srednjeg stepena. Hipoglikemija, hipoalbuminemija i hipoholesterolemija kod ketoznih krava, ukazuje na smanjenu sintetsku funkciju ćelija jetre, a značajno povećana koncentracija ukupnog bilirubina i aktivnost AST u krvnom serumu kao i značajna pozitivna korelacija između aktivnosti AST i koncentracije bilirubina u krvi sa sadržajem masti u jetri na narušen morfološki integritet ćelija jetre kod krava obolelih od ketoze.

LITERATURA

- ACORDA J. A., YAMADA H., GLAMSARI S. M.: Comparative evaluation of fatty infiltration of the liver in dairy cattle by using blood and serum analysis. *The Veterinary Quarterly*, vol 17, No 1. 225–231. (1995)
- ANDREWS, A.H.: *Bovine Medicine*, 2nd edition: Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, (2004)
- BOBE, G.: Pathology, etiology, prevention and treatment of fatty liver in dairy cows, *J. Dairy Sci* 87, 3105–3124, (2004)
- DJOKOVIĆ, R., ŠAMANC, H., RADOJIČIĆ BILJANA., BOJKOVSKI, J., JANKOVIĆ, D.: Savremene metode kliničke dijagnostike oboljenja jetre mlečnih krava. Četvrto Savetovanje iz kliničke patologije i terapije životinja sa međunarodnim učešćem "Clinica Veterinaria" Budva, 10–14 juni. (2002)
- FORENBACHER S.: Klinička patologija probave i mijene tvari domaćih životinja, svezak 2, jetra. Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Zagreb. (1993)
- GAAL T., ROBERTS J., REID I., M., DEW M., COOP M.: Blood composition and liver fat in post parturient dairy cows. *Veterinary Record*, 113, 53–54. (1983)
- GAAL T.: Sindrom masne jetre u mlečnih krava. *Vet. Glasnik*, 47, 4–5, 311–317. (1993)
- GAAL T.: .New approaches of cattle liver diseases. Zbornik radova, 13. Savetovanje veterinarara, Srbije Zlatibor. (2001)
- GAAL, T.: Sindrom masne jetre kod krava str. 163–168., Simpozijum "Ishrana, Reprodukcijska i zaštita zdravlja goveda" zbornik radova Subotica, (2005).
- GROHN Y. Liver function and morphology associated with fatty liver and ketosis in dairy cows. Academic dissertation, Helsinki (1985)
- HUSVETH F., KARSAI F., GAAL T. Periparturient fluctuation of plasma and hepatic lipid components in dairy cows. *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae*, 30, 97–112. (1982)
- JOVANOVIĆ M. J., ŠAMANC H., DAMNJANOVIĆ Z., MARKOVIĆ S., DJOKOVIĆ, R Funkcionalno stanje jetre krava u visokom graviditetu i ranoj laktaciji. *Vet. glasnik*, 47, 4–5, 295–310. (1993)
- JOORRITSMA, R.: Negative energy balance in dairy cows as related to fertility: Thesis, Utrecht, (2003)
- KAUPPINEN K.: ALAT, AP, ASAT, GGT, OCT activities, urea and bilirubin concentrations in plasma of normal and ketotic dairy cows. *Zbl. Vet. Med.* 31, A, 567–572. (1984)
- KRDŽALIĆ P., MATEIĆ MILANKA., JOVANOVIĆ M., SOFRENOVIĆ DJ., MILČIĆ D., VUJOVIĆ M. Ispitivanje korelativnih odnosa između patoloških promena u jetri krava i biohemiskih parametara krvi. *Vet. Glasnik*. 11, 947–952. (1982)
- NIELSEN, N.I., INGVAERTSEN, K.L.: Propylene glycol for dairy cows: a review of the metabolism of propylene glycol and its effects on physiological parameters, feed intake, milk production and risk of ketosis, *Anim. Feed Sci. Technol.* **115**, 191–213. (2004)
- VASILEV B.: Bilirubin u krvi i serumu na kravi, klinički zdravi, bolni at ketozat is hepatopati. *Veterinar medicinski Nauki* 2, 7–11. (1979)
- VAZQUEZ-ANON M., BERTICS S., LUCK M., GRUMMER R. Periparturient livetriglyceride and plasma metabolites in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77, 1521–1528. (1994)
- VEENHUIZEN J. J., DRACKLEY J. K., RICHARD M. J., SANDERSON T. P., MILLER L. D., JOUNG J. W. Metabolic changes in blood and liver during development and early treatment of Experimental Fatty liver and ketosis in cows. *J. Dairy Sci.* 74: 4238–4253. (1991)

ŠAMANC, H., NIKOLIĆ, J. ANNA, DJOKOVIĆ, R., KOVAČEVIĆ, M., DAMNJANOVIĆ, Z., IVANOV, I., BOJKOVSKI, J.: Relation between peripheral hormone levels and liver morphology in health and ketotic cows. *Lucarile Stientifice Medicina veterinaria*, 3325, Timisoara, (2000).

MORPHOLOGICAL AND FUNCIONAL CONDITION OF HEPATOCYTES BY DAIRY COWS IN EARLY LACTATION

RADOJICA ĐOKOVIĆ, HOREA ŠAMANC, JOVAN BOJKOVSKI, SUNČICA BOROZAN, SNEŽANA BOŠKOVIĆ-BOGOSAVLJEVIĆ

Summary

During our experiment we investigated morphological and functional condition of hepatocytes by dairy cows in early lactation. For this experiment we chose 20 cows Holstein breed in period after parturition 3 to 7 days. Cows divided in two groups. Group health cows (n=10) and group with clinical signs ketosis (n=10). We took samples of hepatic tissue and blood samples. Glucosa concentration in blood determine with enzymic method specific for glucosa. Cholesterol, albumin, total bilirubin, and activity AST in blood serum determined spectrophotometry with used commercial package (Dialab, Vienna, Austria). We done patohistological investigated, content fat in hepatic tissue determined stereometric. Statistic values among health and ketotic cows determined for content fat in hepatocytes (9,35: 32,91%, $p < 0,01$), concentration glucosa (2,71: 1,80 mmol/l, $p < 0,01$), albumin (34,39: 31,73 g/l $p < 0,01$), total bilirubin (5,80: 6,79 $\mu\text{m/l}$, $p < 0,01$) and activity AST (92,80: 131,60 IU/l, $p < 0,01$) in blood serum, as important positive correlation ($r = 0,69$) among activity AST in blood serum and content fat in hepatocytes by ketotic cows. Finally, we can conclude that ketotic cows is presence fat infiltration and hepatocytes degeneration. Hypoglycemia, hypoalbuminemia and hypocholesteremia by ketotic cows show decrease synthetic function of hepatocytes, very important increase concentration total bilirubin and activity AST in blood serum, as important positive correlation among activity AST in blood and content fat in liver and disturbance morphological integrity of hepatocytes by ketotic cows.

Key words: dairy cow, ketosis, liver.