

Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

IRIS MARINKOVIĆ, apsolventica

**Povezanost metabolizma masnih tvari i magnezija u krava
tijekom kasne gravidnosti i rane laktacije**

Zagreb, 2009.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za fiziologiju i radiobiologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom dr. sc. Natalije Filipović, zn. sur., u sklopu znanstvenog projekta «Metabolizam minerala u domaćih životinja u uvjetima visoke proizvodnje i stresa» (053-1080229-2104, MZOŠ RH), voditelja prof. dr. sc. Zvonka Stojevića i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2008/2009.

Popis i objašnjenje kratica korištenih u radu

Acetil CoA – acetil koenzim A

HDL – lipoproteini velike gustoće (eng. high density lipoproteins)

HMG-CoA – hidroksimetil-glutaril koenzim A

LCAT – lecitin-kolesterol acil transferaza (eng. lecithin : cholesterol acyltransferase)

LDL – lipoproteini male gustoće (eng. low density lipoproteins)

PTH - paratireoidni hormon

SD - standardna devijacija

SMK – slobodne masne kiseline

SV - srednja vrijednost

VLDL - lipoproteini vrlo male gustoće (eng. very low density lipoproteins)

Sadržaj rada

	str.
Uvod	1
Hipoteza	3
Opći i specifični ciljevi rada	4
Materijal i metode	4
Rezultati	5
Rasprava	10
Zaključci	12
Popis literature	13
Sažetak	18
Summary	19

Uvod

Metabolizam mliječnih krava opterećen je visokom proizvodnjom i kratkim periodom suhostaja te relativno čestim teljenjima. Najveće promjene u organizmu dešavaju se u prijelaznom razdoblju oko poroda. Tijekom gravidnosti masno tkivo se prilagođava potrebama organizma. U prvoj polovici gravidnosti u organizmu krave prevladava proces lipogeneze, a u kasnijoj se fazi masno tkivo iskorištava za energetske svrhe, za rast fetusa te u početku laktacije za proizvodnju mlijeka (McNAMARA i HILLERS, 1986). U početku laktacije u krava dolazi do naglog povećanja potreba u tvarima neophodnim za stvaranje mlijeka i energetskog disbalansa, koji u pravilu dovodi do značajnih promjena metabolizma (FILIPOVIĆ i sur., 2007; FILIPOVIĆ i sur., 2008). Zbog visoke proizvodnje mlijeka u mliječnim krava, unos hrane u početku laktacije često ne zadovoljava potrebe za održavanje i proizvodnju mlijeka (GOFF i HORST, 1997). Posljedica energetske neravnoteže je povećani obim lipolize i znatni porast razine slobodnih masnih kiselina u plazmi (SMK) (McNAMARA i HILLERS, 1986; BRUSS, 1997). U jetri se SMK reesterificiraju i otpuštaju u krvotok u sastavu lipoproteina vrlo male gustoće (VLDL, eng. very low density lipoproteins) te se kao posljedica javlja i porast koncentracije triglicerida u plazmi (BRUSS, 1997). SMK se razgrađuju procesom beta-oksidacije (VERNON, 2005) te se intenzivnije stvara acetil koenzim A (acetil CoA) (ZAMMIT, 1983), što može imati za posljedicu povećanu tvorbu ketonskih tijela u jetri (ZAMMIT, 1983; BRUSS, 1997). Povećano stvaranje acetil CoA ima za posljedicu i pojačanu sintezu kolesterola, budući da je aktivnost jetrene hidrosimetilglutaril koenzim A (HMG-CoA) reduktaze, glavnog regulacijskog enzima u sintezi kolesterola, regulirana između ostalog i dostupnošću glavnog supstrata, upravo acetil CoA (GIBBONS, 2003). Kolesterol je pronađen samo u životinjskom organizmu, pa kod biljoždera praktički ne postoji unos kolesterola hranom (BEITZ, 2004). Sinteza kolesterola odvija se u jetri, u vrlo malom opsegu i u kori nadbubrežne žlijezde, testisima i jajnicima (BEITZ, 2004). Sinteza kolesterola u jetri potiču snižena razina kolesterola u krvi i inzulin, a koče povišena koncentracija kolesterola u plazmi, glukagon, i glukokortikoidi (BRUSS, 1997). Kolesterol sintetiziran u jetri može se izlučiti putem žuči, poslužiti za sintezu žučnih kiselina ili esterificirati sa višim masnim kiselinama i izlučiti u krv kao dio VLDL. Osim u sastavu VLDL, kolesterol se u krvi prenosi u sastavu lipoproteina velike gustoće (HDL, eng. high density lipoproteins), čija je uloga prijenos kolesterola iz perifernih tkiva u jetru (TALL i LANGE, 1978). Lipidi u plazmi ne cirkuliraju slobodno, budući da su netopivi u vodi, već ih nalazimo kao konglomerate s bjelančevinama, koje nazivamo lipoproteini. Lipoproteini krvne plazme sintetiziraju se gotovo isključivo u jetri i tankom crijevu (BRUSS, 1997). Uloge su im transport većine lipida, osim steroidnih hormona i SMK, među tkivima i esterifikacija kolesterola (MAHLEY i sur., 1984; GINSBERG, 1990). Gustoća lipoproteina ovisi o omjeru lipidne i bjelančevinske komponente. Prema gustoći dijele se u slijedeće razrede: hilomikroni ($d < 0.94$ g/mL), VLDL ($d = 0.94 - 1.006$ g/mL), lipoproteine male gustoće (LDL, eng. low density lipoproteins) ($d = 1.006 - 1.063$ g/mL) i HDL ($d = 1.063 - 1.21$ g/mL) (MAHLEY i sur., 1984). Lipidnu komponentu lipoproteina

sačinjavaju kolesterol, trigliceridi i fosfolipidi, a bjelančevinsku apolipoproteini. Hilomikroni nastaju resorpcijom lipida iz crijeva putem limfnih kapilara. VLDL prenose trigliceride, kolesterol i fosfolipide sintetizirane u jetri do perifernih tkiva. LDL predstavljaju ostatke nakon razgradnje triglicerida i kolesterola iz VLDL-a i hilomikrona. HDL se sintetiziraju u jetri i tankom crijevu, a važna uloga im je transport kolesterola iz perifernih tkiva do jetre (BRUSS, 1997). HDL sadrže lecitin-kolesterol acil transferazu (LCAT, eng. lecithin : cholesterol acyltransferase), enzim sintetiziran u jetri, koji prevodi kolesterol u estere kolesterola, čime se stvara povoljan koncentracijski gradijent za migraciju kolesterola iz tkiva u HDL (FRANCONE i FIELDING, 1991; BRUSS, 1997). HDL prevladavaju u plazmi domaćih životinja u gladovanju (BRUSS, 1997) te stoga i tijekom energetske disbalansa u kasnoj gravidnosti i ranoj laktaciji u krava.

Veliki stupanj negativne energetske ravnoteže u početku laktacije i posljedično nastali metabolički poremećaji povezani su s oslabljenim zdravstvenim stanjem, smanjenom proizvodnom i reproduktivnom sposobnošću mliječnih krava (VEENHUIZEN i sur., 1991). Stoga je poznavanje i razumijevanje metaboličkih procesa tijekom gravidnosti i laktacije te njihove regulacije i međusobne povezanosti temelj za prevenciju poremećaja i umanjeње ekonomske štete u govedarskoj proizvodnji. Dosadašnjim istraživanjima na pokusnim životinjama i ljudima ustanovljena je snažna indikacija da magnezij ima izravni utjecaj na metabolizam masti. OLATUNJI i SOLADOYE (2007) u svojem istraživanju na štakorima dokazali su da dodavanje magnezija u hranu snižava koncentraciju kolesterola i triglicerida u serumu. ALTURA i sur. (1990) su došli do istog zaključka u pokusu na kunićima, dokazavši da smanjenje količine magnezija u hrani dovodi do porasta koncentracije kolesterola i triglicerida u krvnom serumu. Istraživanja u ljudi su provedena s ciljem otkrivanja boljih načina liječenja arterioskleroze ili metaboličkog sindroma i pretilosti. GUERRERO-ROMERO i RODRIGUEZ-MORÁN (2002) su istražujući metabolički sindrom u ljudi uočili da pacijenti s dislipidemijom i metaboličkim sindromom imaju nižu serumsku koncentraciju magnezija u usporedbi sa kontrolnom skupinom, a najveću korelaciju su zabilježili između magnezija i HDL-kolesterola. Uspoređujući učinke magnezija i statina, lijekova koji se koriste za snižavanje krvnog kolesterola u ljudi, došlo se do zaključka da se dodatkom magnezija smanjuje koncentracija LDL-kolesterola, a povećava koncentracija HDL-kolesterola u plazmi, te da magnezij poboljšava sve aspekte dislipidemije, što uključuje povećanje koncentracije HDL i smanjenje koncentracije triglicerida, s puno manje nuspojave nego statini (ROSANOFF i SEELING, 2004).

Magnezij je najzastupljeniji dvovalentni unutarstanični kation. Ima brojne uloge u organizmu: sudjeluje u regulaciji kontrakcije mišića, metabolizmu masti, proteina i ugljikohidrata, oksidativnoj fosforilaciji, stabilizaciji membrana i imunološkim odgovorima (MURPHY, 2000; GOFF, 2004). Primarno ima funkciju kofaktora više od 300 enzima te je tako neophodan za njihovo djelovanje (FONTENOT i sur., 1989; OLATUNJI i SOLADOYE, 2007). Adenozin trifosfataza je aktivirana sa Mg^{2+} , a inhibirana sa Ca^{2+} te su sve reakcije koje koriste i ATP ovisne o magneziju, budući da je unutarstanični supstrat kompleks Mg-ATP (ROSOL i CAPEN, 1997). Ne postoji izravni hormonalni

mehanizam kontrole prometa magnezija, tako da je održavanje stalne koncentracije magnezija u plazmi ovisno o konstantnom dotoku hranom. U monogastričnih životinja i sisajuće teladi magnezij se resorbira u ileumu i kolonu, a u odraslih preživača glavno mjesto resorpcije magnezija su burag i kapura, te sirište, dok se u tankim crijevima ovih životinja magnezij izlučuje (FONTENOT i sur., 1989; GOFF, 2004). Magnezij se u složenom želucu resorbira aktivno – kotransportom s natrijem, ali i pasivno. Opseg resorpcije magnezija ovisan je o koncentraciji otopljenog magnezija u sadržaju buraga, koja ovisi o: sadržaju magnezija u hrani, pH sadržaja buraga (topivost magnezija naglo opada kod pH iznad 6,5) te vezanju magnezija u hrani u obliku netopivih soli (s palmitinskom, linolnom i linolenskom kiselinom i derivatima transakonične kiseline) (GOFF, 2004). Višak kalija, kojim obiluje svježa zelena masa koja se koristi u hranidbi preživača, smanjuje resorpciju magnezija, budući da uzrokuje depolarizaciju apikalnih membrana epitela buraga, smanjujući potencijal transepitelne membrane preko koje se magnezij resorbira u krv (GOFF, 2004). Stoga su preživači skloni pojavi hipomagnezijemije, koja se najčešće očituje kao tzv. «pašna tetanija». Do pasivne resorpcije magnezija iz predželudaca dolazi samo ukoliko je koncentracija magnezija četverostruko veća od koncentracije u krvi (GOFF, 2008). Glavni mehanizam regulacije koncentracije magnezija u plazmi je izlučivanje bubrezima. Tako se magnezij resorbiran iz probavnog trakta u suvišku (iznad praga bubrežne reapsorpcije: 0,75-0,90 mmol/L) izlučuje mokraćom. Metabolizam magnezija je povezan s metabolizmom kalcija. Međusobno se mogu odnositi kao sinergisti ili antagonisti, ovisno o molekulama na koje se vežu (ROSOL i CAPEN, 1997). Oba metabolizma su usko povezana sa cirkulacijskom razinom paratireoidnog hormona (PTH) (FONTENOT i sur., 1989; AGUS, 1999). PTH izlučen kao odgovor na hipokalcemiju povećava bubrežni prag i za kalcij i za magnezij, pa ukoliko je resorpcija magnezija iz probavnog trakta adekvatna, može doći do porasta koncentracije magnezija u plazmi, u suprotnom koncentracija magnezija neće porasti.

Mehanizam djelovanja magnezija na metabolizam masti uključuje višestruka djelovanja. Magnezij je kofaktor enzima izocitrat-dehidrogenaze, koji sudjeluje u ciklusu limunske kiseline i koji bez magnezija ne može doseći punu aktivnost (WILLSON i TIPTON, 1981). Ciklus limunske kiseline je osnovna poveznica energetskog metabolizma u koju su posredno ili neposredno uključeni metabolizam masti, ugljikohidrata i aminokiselina. Iz navedenoga proizlazi ključno djelovanje magnezija u regulaciji metabolizma, pa tako i metabolizma masti. Također je utvrđena uloga magnezija u regulaciji aktivnosti brojnih enzima uključenih izravno u metabolizam masti (RAYSSIGUIER i sur., 1991; NASSIR i sur., 1995; ROSANOFF i SEELING, 2004).

Hipoteza

Dokazano je da magnezij ima značajan utjecaj na metabolizam masti u ljudi i pokusnih životinja. O istraživanjima povezanosti magnezija i metabolizma lipida u mliječnim krava ne postoje

podaci u literaturi. Budući da se u razdoblju kasne gravidnosti, pri porodu i u ranoj laktaciji u mliječnih krava zbivaju izuzetno naglašene promjene metabolizma lipida, neizbježna je pretpostavka da bi ove promjene, analogno drugim vrstama, mogle biti povezane s metabolizmom magnezija. Stoga smo istražili moguću povezanost koncentracije magnezija s kretanjem pokazatelja metabolizma masnih tvari u krvnom serumu krava holštajnske pasmine.

Opći i specifični ciljevi rada

1. Istražiti kretanje koncentracija pokazatelja metabolizma masnih tvari u krvnom serumu krava tijekom suhostaja i rane laktacije.
2. Istražiti kretanje koncentracija magnezija u krvnom serumu krava tijekom suhostaja i rane laktacije.
3. Utvrditi postoji li povezanost između koncentracija magnezija i pokazatelja metabolizma masnih tvari u krvnom serumu.
4. Usporediti rezultate koji se odnose na povezanost koncentracija magnezija i masnih tvari s literaturnim podacima za dosad istraživane vrste, te utvrditi da li je povezanost istog ili sličnog karaktera.
5. Na temelju dobivenih rezultata i dosadašnjih spoznaja izvesti zaključke o stupnju, karakteru i eventualnim uzrocima povezanosti metabolizma minerala i masnih tvari u krava tijekom kasne gravidnosti i rane laktacije.

Materijal i metode

Istraživanje je provedeno na 65 krava holštajnske pasmine od druge do četvrte laktacije. Životinje su držane u objektima sa slobodnim držanjem. Sastav obroka bio je prilagođen proizvodnom ciklusu. Uzorci za analizu uzimani su tijekom tri pokusna razdoblja: u suhostaju, odnosno 14 (n=23) dana prije teljenja (-14), te 10. (n=19) i 30. (n=23) dana po teljenju (+10 i +30). Da bi se izbjegle dnevne fluktuacije, uzorci su uvijek uzimani između 9.00 i 10.00 sati ujutro, nakon mužnje. Krv je uzimana punkcijom *v. jugularis externa* u BD Vacutainer epruvete (BD Diagnostics, Plymouth, Velika Britanija), a krvni serum je izdvojen centrifugiranjem na 1500 g tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi. Alikvotirani uzorci krvnog seruma pohranjeni su na -20°C do analiza. Koncentracije

ukupnog kolesterola i magnezija određene su na automatskom analizatoru (SABA 18, AMS, Italija), pomoću gotovih kompleta reagensa (Kolesterol- PAP i Magnezij, kolorimetrijska metoda, proizvođača Herbos Dijagnostika, Hrvatska). Koncentracija ukupnih lipida određena je na aparatu Helios Delta Vis Spectrophotometer (Pye Unicam, Velika Britanija), kolorimetrijskom metodom, korištenjem gotovog kompleta Total lipids (RANDOX Laboratories Ltd., Velika Britanija). Elektroforezom na celuloza-acetatu određeni su udjeli frakcija lipoproteina, a njihove apsolutne koncentracije izračunate iz koncentracije ukupnih lipida. Ukratko, elektroforeza je učinjena na trakama celuloza-acetata (Cellogel, MALTA Chemetron, Milano, Italija) u Tris hipurat puferu, pH 8,8 (MALTA Chemetron, Milano, Italija) na 200 V tijekom 40 minuta. Trake su obojene mješavinom Sudan Black B boje i 5% NaOH (1:1). Međusobni odnos i apsolutna koncentracija određeni su pomoću denzimetra (Glob-Al Scan, MALTA Chemetron, Milano, Italija). U radu su prikazane samo koncentracije lipoproteina velike gustoće (HDL). Rezultati su statistički obrađeni korištenjem softverskog paketa Statistica 7.1 (StatSoft, SAD). Usporedba triju pokusnih razdoblja provedena je pomoću analize varijance (One Way ANOVA) i post-hoc Tukey testa. Povezanost između istraživanih pokazatelja utvrđena je određivanjem koeficijenta linearne korelacije. Razlike i korelacije na razini $p < 0,05$ smatrane su statistički značajnima.

Rezultati

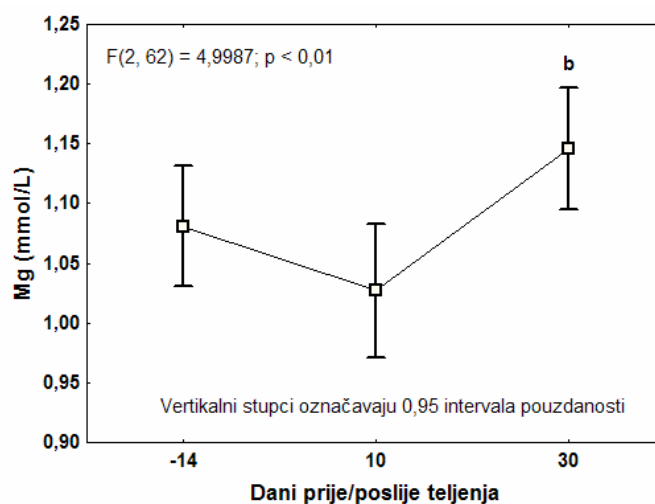
Rezultati istraživanja prikazani su u tablicama 1-5., te na slikama 1-4. Utvrđene su značajne promjene koncentracija magnezija tijekom istraživanih razdoblja ($p < 0,01$; Tablica 1. i Slika 1). Koncentracija magnezija bila je značajno viša u trećem u odnosu na drugo pokusno razdoblje ($p < 0,05$). Također su utvrđene značajne promjene koncentracija ukupnog kolesterola ($p < 0,0001$; Tablica 1). Koncentracija kolesterola bila je značajno viša u trećem pokusnom razdoblju u odnosu na prvo i drugo ($p < 0,001$). Koncentracije ukupnih lipida također su se značajno razlikovale između istraživanih razdoblja ($p < 0,01$; Tablica 1). Koncentracija ukupnih lipida bila je značajno viša u trećem pokusnom razdoblju u odnosu na prvo ($p < 0,01$) i drugo pokusno razdoblje ($p < 0,05$). Utvrđene su značajne razlike koncentracija HDL u krvnom serumu između istraživanih razdoblja ($p < 0,001$; Tablica 1). Koncentracija HDL značajno je porasla u trećem u odnosu na prvo pokusno razdoblje ($p < 0,001$) i drugo pokusno razdoblje ($p < 0,05$). Linearna korelacija između istraživanih pokazatelja u krvnom serumu krava ukupno tijekom svih istraživanih razdoblja ($n = 65$) prikazana je u Tablici 2. i na slikama 2-4. Utvrđen je visoki stupanj pozitivne korelacije između koncentracija kolesterola, ukupnih lipida i HDL međusobno (Tablica 2) te srednji stupanj pozitivne korelacije između koncentracije magnezija i ostalih istraživanih pokazatelja (Tablica 2 i slike 2-4). 14 dana prije teljenja ($n = 23$) utvrđena je značajna korelacija između koncentracija kolesterola, ukupnih lipida i HDL međusobno, dok korelacija između koncentracija magnezija i ostalih istraživanih pokazatelja nije utvrđena (Tablica 3). 10. dana (n

= 19) i 30. dana nakon teljenja (n = 23) također je utvrđen visoki stupanj pozitivne korelacije između koncentracija kolesterola, ukupnih lipida i HDL međusobno te srednji stupanj pozitivne korelacije između koncentracije magnezija i ostalih istraživanih pokazatelja (Tablice 4. i 5).

Tablica 1. Deskriptivna statistika koncentracija magnezija, kolesterola, ukupnih lipida i HDL u krvnom serumu krava holštajnske pasmine tijekom suhostaja i rane laktacije

Sv – srednja vrijednost, SD – standardna devijacija, HDL – lipoproteini velike gustoće. Statistički značajne razlike u odnosu na «- 14 dana prije teljenja» na razini ^{aa} – p<0,01, ^{aaa} – p<0,001; u odnosu na «10 dana nakon teljenja» ^b – p<0,05, ^{bbb} – p<0,001.

POKAZATELJI	Dani prije/poslije teljenja			p ANOVA
	-14	10	30	
	Sv ± SD	Sv ± SD	Sv ± SD	
Mg (mmol/L)	1,08 ± 0,11	1,03 ± 0,14	1,15 ± 0,12 ^b	<0,01
KOLESTEROL (mmol/L)	2,51 ± 0,40	2,53 ± 0,64	3,69 ± 1,34 ^{aaa, bbb}	<0,0001
UKUPNI LIPIDI (g/L)	2,75 ± 0,41	2,75 ± 0,78	3,55 ± 1,13 ^{aa, b}	<0,01
HDL (g/L)	1,77 ± 0,42	2,09 ± 0,75	2,85 ± 1,16 ^{aaa, b}	<0,001



Slika 1. Kretanje koncentracija magnezija u krvnom serumu krava holštajnske pasmine tijekom suhostaja i rane laktacije. Statistički značajne razlike u odnosu na «10 dana nakon teljenja» ^b – p<0,05.

Tablica 2. Prikaz linearne korelacije između koncentracija kolesterola, ukupnih lipida, HDL i magnezija u krvnom serumu krava holštajnske pasmine tijekom suhostaja i rane laktacije ukupno tijekom svih istraživanih razdoblja (n = 65)

Statistička značajnost na razini **** - $p < 0,0001$, *** - $p < 0,001$. HDL – lipoproteini velike gustoće.

	KOLESTEROL (mmol/L)	UKUPNI LIPIDI (g/L)	HDL (g/L)
KOLESTEROL (mmol/L)			
UKUPNI LIPIDI (g/L)	**** 0,862		
HDL (g/L)	**** 0,880	**** 0,948	
Mg (mmol/L)	**** 0,494	**** 0,487	*** 0,438

Tablica 3. Prikaz linearne korelacije između koncentracija kolesterola, ukupnih lipida, HDL i magnezija u krvnom serumu krava holštajnske pasmine tijekom suhostaja (14 dana prije očekivanog teljenja; n = 23)

Statistička značajnost na razini *** - $p < 0,001$, * - $p < 0,05$. HDL – lipoproteini velike gustoće.

	KOLESTEROL (mmol/L)	UKUPNI LIPIDI (g/L)	HDL (g/L)
KOLESTEROL (mmol/L)			
UKUPNI LIPIDI (g/L)	0,382		
HDL (g/L)	* 0,501	*** 0,636	
Mg (mmol/L)	0,126	- 0,015	- 0,079

Tablica 4. Prikaz linearne korelacije između koncentracija kolesterola, ukupnih lipida, HDL i magnezija u krvnom serumu krava holštajnske pasmine 10. dana nakon teljenja (n = 19)

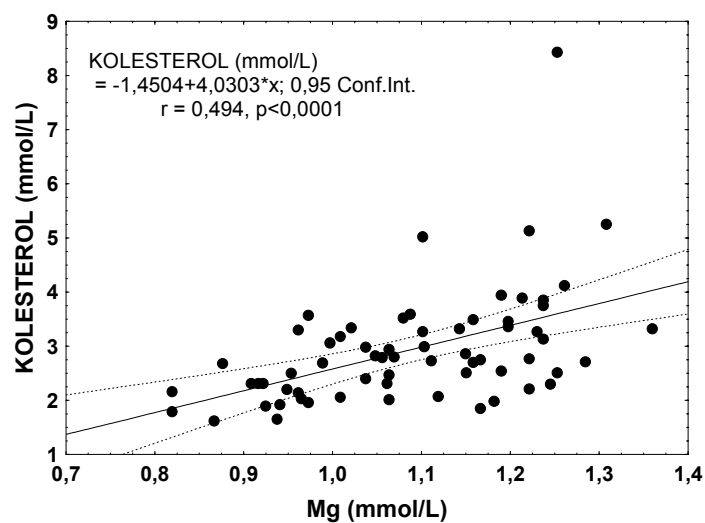
Statistička značajnost na razini **** - $p < 0,0001$, *** - $p < 0,001$, ** - $p < 0,01$. HDL – lipoproteini velike gustoće.

	KOLESTEROL (mmol/L)	UKUPNI LIPIDI (g/L)	HDL (g/L)
KOLESTEROL (mmol/L)			
UKUPNI LIPIDI (g/L)	**** 0,807		
HDL (g/L)	**** 0,831	**** 0,973	
Mg (mmol/L)	*** 0,755	** 0,649	** 0,671

Tablica 5. Prikaz linearne korelacije između koncentracija kolesterola, ukupnih lipida, HDL i magnezija u krvnom serumu krava holštajnske pasmine 30. dana nakon teljenja (n = 23)

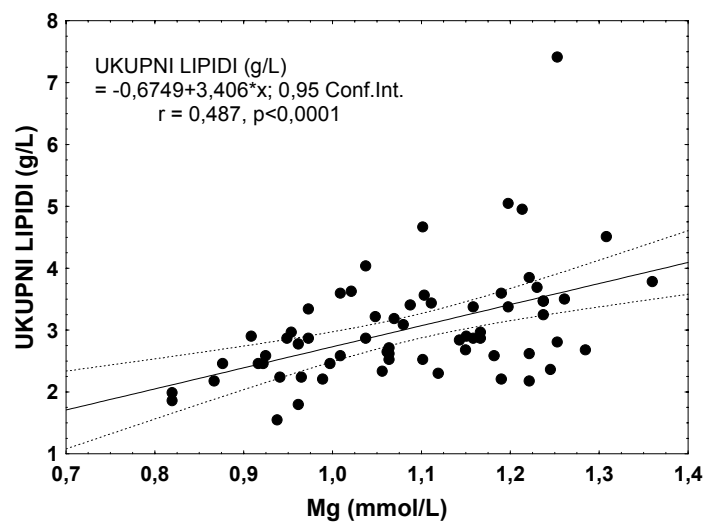
Statistička značajnost na razini **** - $p < 0,0001$, * - $p < 0,05$. HDL – lipoproteini velike gustoće.

	KOLESTEROL (mmol/L)	UKUPNI LIPIDI (g/L)	HDL (g/L)
KOLESTEROL (mmol/L)			
UKUPNI LIPIDI (g/L)	**** 0,897		
HDL (g/L)	**** 0,900	**** 0,979	
Mg (mmol/L)	* 0,414	* 0,459	* 0,405



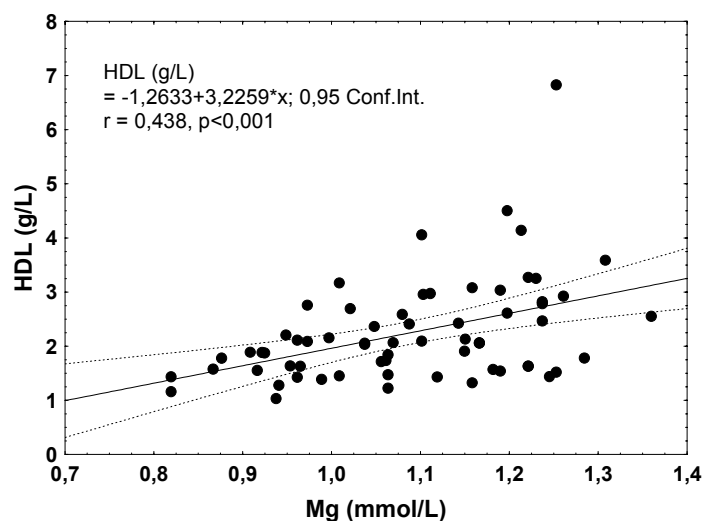
Slika 2. Linearna korelacija između koncentracija magnezija i ukupnog kolesterola u krvnom serumu krava holštajnske pasmine tijekom suhostaja i rane laktacije ukupno tijekom svih istraživanih razdoblja (n = 65)

HDL – lipoproteini velike gustoće, Conf.Int. – interval pouzdanosti.



Slika 3. Linearna korelacija između koncentracija magnezija i ukupnih lipida u krvnom serumu krava holštajnske pasmine tijekom suhostaja i rane laktacije ukupno tijekom svih istraživanih razdoblja (n = 65)

HDL – lipoproteini velike gustoće, Conf.Int. – interval pouzdanosti.



Slika 4. Linearna korelacija između koncentracija magnezija i HDL u krvnom serumu krava holštajnske pasmine tijekom suhostaja i rane laktacije ukupno tijekom svih istraživanih razdoblja (n = 65)

HDL – lipoproteini velike gustoće, Conf.Int. – interval pouzdanosti.

Rasprava

Početak laktacije u mliječnim krava predstavlja metabolički kritično razdoblje. Unatoč daljnjem povišenju proizvodnje mlijeka, prema vrhuncu laktacije dolazi do postepene adaptacije metabolizma na što ukazuju i rezultati ovog istraživanja. Rezultati istraživanja pokazali su značajni porast razine ukupnih lipida u krvnom serumu 30. dana laktacije (Tablica 1). Opisane promjene mogu se objasniti porastom koncentracije kolesterola, budući da on sačinjava najveći udio ukupnih lipida (BRUSS, 1997). Razina ukupnih lipida stoga prvenstveno ovisi o koncentraciji kolesterola. Navedenu tvrdnju potkrepljuje uočeni visoki stupanj korelacije između ukupnih lipida i kolesterola i njihovo paralelno kretanje. Fiziološke koncentracije ukupnog kolesterola u krvi krava kreću se 2,07-3,11 mmol/L (KANEKO i sur., 1997). Koncentracije kolesterola u krvnom serumu istraživanih krava 14 dana prije teljenja i 10. dana po teljenju kretale su se u rasponu fizioloških vrijednosti, dok su prosječne koncentracije kolesterola 30. dana poslije teljenja značajno porasle (Tablica 1) i bile više u odnosu na referentne vrijednosti. Ovi rezultati u skladu su s rezultatima HOLTENIUS-a (1989), koji je utvrdio pad kolesterola od 6. tjedna prije do 1. dana po teljenju, te porast kolesterola poslije teljenja. Slično tome TAINURIER i sur. (1984) su utvrdili smanjenje koncentracije serumskog kolesterola na kraju steonosti. Niže razine kolesterola u razdoblju prije poroda mogu se povezati s intenzivnom potrošnjom kolesterola za potrebe razvoja ploda. Niže koncentracije kolesterola u serumu krava 10. dana po porodu mogle bi se objasniti padom tjelesne kondicije u početku laktacije. Naime, utvrđeno je da su

niže razine kolesterola u razdoblju mjesec dana nakon poroda u krava izravno povezane sa stupnjem smanjenja tjelesne kondicije u početku laktacije (KIM i SUH, 2003). Značajan porast razine HDL u serumu 30. dana laktacije, utvrđen ovim istraživanjem (Tablica 1), koji je bio u visokom stupnju korelacije sa razinom kolesterola i ukupnih lipida (Tablice 1-4), ukazuje na mobilizaciju kolesterola iz perifernih tkiva i/ili pojačanu izmjenu kolesterola između frakcija lipoproteina (BRUSS, 1997). Međutim, ovi rezultati mogli bi biti i odraz smanjene mogućnosti jetrenih stanica da prihvaćaju i prerađuju kolesterol te njegovog nakupljanja u krvi. Naime, u većine mliječnih krava prije poroda i u početku laktacije zabilježeno je nakupljanje triglicerida u stanicama jetre, što se povezuje s njihovom oslabljenom funkcionalnošću (REID, 1980; VERNON, 2005). Fiziološke koncentracije magnezija u krvnom serumu goveda iznose $1,05 \pm 0,20$ mmol/L (ROSOL i CAPEN, 1997). Koncentracije magnezija u krvnom serumu krava tijekom ovog istraživanja kretale su se u okviru referentnih vrijednosti, ali su značajno porasle 30. dana nakon teljenja (Tablica 1. i Slika 1). Porast koncentracije magnezija 30. dana nakon teljenja može se objasniti spregom s PTH i metabolizmom kalcija. Naime, poznato je da u mliječnih krava u početku laktacije dolazi do velikog gubitka kalcija mlijekom, što se kompenzira porastom lučenja PTH i povećanim obimom mobilizacije kalcija iz kostura (HORST i sur., 2005). PTH podiže prag za bubrežnu ekskreciju magnezija, te se tako povisuje i koncentracija magnezija u krvi, ako ga u hrani ima dovoljno (FONTENOT i sur., 1989). Pozitivna korelacija između serumskih koncentracija magnezija s jedne te kolesterola (Slika 2), ukupnih lipida (Slika 3) i HDL (Slika 4) s druge strane, u suglasju je s rezultatima većine istraživanja u drugih vrsta. Utvrđeno je da magnezij izravno koči sintezu kolesterola u jetri (ROSANOFF i SEELING, 2004). Magnezij, kao Mg-ATP kompleks, omogućuje inaktivaciju enzima HMG-CoA reduktaze, te tako smanjuje opseg sinteze kolesterola (ROSANOFF i SEELING., 2004). Međutim, brojnim istraživanjima u ljudi (FEHILY i sur., 1988; SINGH i sur., 1990; SCHULPIS i sur., 2004; GUERRERO-ROMERO i RODRIGUEZ-MORÁN, 2006) i laboratorijskih životinja (RAYSSIGUIER i sur., 1981; GUEUX i sur., 1995; NASSIR i sur., 1995; LUOMA i sur., 1998) utvrđena je naglašena pozitivna korelacija između koncentracije magnezija u krvi i/ili unosa magnezija hranom i koncentracije HDL-kolesterola. Ova povezanost može se objasniti djelovanjem magnezija na aktivnost LCAT (RAYSSIGUIER i sur., 1981; ROSANOFF i SEELING, 2004). Naime, magnezij je neophodan za aktivnost LCAT (ROSANOFF i SEELING, 2004), te tako sudjeluje u regulaciji esterifikacije kolesterola u sastavu lipoproteina, osobito HDL, što pogoduje migraciji kolesterola iz tkiva u krvotok (FRANCONE i FIELDING, 1991) i na taj način izravno povećava koncentraciju HDL-kolesterola, unatoč smanjenoj sintezi kolesterola u jetri. Također, pozitivna povezanost između koncentracija magnezija i HDL djelomično bi se mogla objasniti i utjecajem magnezija na sintezu apolipoproteina (ALTURA i sur., 1990). Tako su NASSIR i sur. (1995) utvrdili u jetri štakora s nedostatkom magnezija značajno smanjenje izražaja mRNA za apolipoproteine E, koji su značajan sastojak svih frakcija lipoproteina, osobito HDL. SCHULPIS i sur. (2004) utvrdili su u djece oboljele od fenilketonurije, ali i u skupini zdrave djece, pozitivnu korelaciju između koncentracije magnezija, HDL i apolipoproteina A-I, čija se koncentracija u ljudi također

izravno povezuje s koncentracijom HDL (SCHAEFER i sur., 1983). Također je utvrđena obrnuta povezanost između unosa magnezija hranom u štakora i sinteze apolipoproteina B skupine, kojom se djelomično objašnjava porast frakcija lipoproteina bogatih trigliceridima (VLDL i LDL) koji se javlja kod nedostatka magnezija (GUEUX i sur., 1995; NASSIR i sur., 1995). Razmatranje povezanosti između koncentracija magnezija i kolesterola vrlo je složeno budući da je komplicirano činjenicom da veliki porast koncentracije kolesterola može uzrokovati gubitak magnezija iz mekih tkiva i njegov prelazak u plazmu (ALTURA i sur., 1990). Također u ovom istraživanju mjerena je ukupna koncentracija magnezija u serumu iako je poznato da je biološki aktivan samo ionizirani magnezij. Međutim, poznato je da ukupna koncentracija magnezija u visokom stupnju korelira sa slobodnim unutarstaničnim magnezijem te se mjerenje ukupne koncentracije magnezija može smatrati pouzdanim u procjeni metabolizma magnezija (GUERRERO-ROMERO i RODRIGUEZ-MORÁN, 2006). Da bi se izbjegli pogrešni zaključci koji proizlaze iz paralelnog kretanja koncentracije magnezija i masnih tvari u krvi tijekom cjelokupnog istraživanog razdoblja, izvršena je korelacijska analiza u svakom pojedinom istraživanom razdoblju, koja je potvrdila da upravo u razdoblju rane laktacije (10. i 30. dan nakon teljenja; Tablice 4. i 5), kada su promjene u metabolizmu vrlo naglašene, postoji izrazita povezanost između magnezija i metabolizma masnih tvari.

Prikupljeni podaci o istraživanjima na drugim vrstama dokazuju postojanje veze između magnezija i masnih tvari. Ukoliko se uzme u obzir činjenica da je većina dosadašnjih istraživanja provedena na glodavcima, za koje su poznate specifičnosti metabolizma lipida i lipoproteina u odnosu na ljude i druge vrste životinja (CHAO i sur., 1979; MA i sur., 1986; SRIVASTAVA i sur., 2001) te specifičnosti metabolizma magnezija u preživača (GOFF, 2004), ovi podaci ne mogu se izravno primijeniti na goveda kao vrstu, niti na mliječne krave tijekom kasne gravidnosti i rane laktacije. Međutim, uspoređujući podatke dobivene ovim istraživanjem na kravama s literaturnim podacima, došli smo do zaključka da je postojanje takve veze u krava vrlo vjerojatno. Ovim istraživanjem ustanovili smo da i u krava, magnezij ima sličan utjecaj na metabolizam masti kao i u ljudi i pokusnih životinja, prvenstveno na koncentraciju kolesterola u frakciji HDL lipoproteina. Budući da korelacijskom analizom podataka nije moguće dokazati izravni mehanizam navedene povezanosti, već samo njezino postojanje, to ukazuje na potrebu daljnjih istraživanja vezanih uz ovo područje.

Zaključci

1. Visoki stupanj korelacije između ukupnih lipida i kolesterola i njihovo paralelno kretanje ukazuju na ovisnost koncentracije ukupnih lipida u serumu prvenstveno o koncentraciji kolesterola.

2. Utvrđeni značajan porast razine HDL u serumu 30. dana laktacije, koji je bio u visokom stupnju korelacije sa razinom kolesterola i ukupnih lipida, ukazuje na mobilizaciju kolesterola iz perifernih tkiva i/ili pojačanu izmjenu kolesterola između frakcija lipoproteina.
3. U ranoj laktaciji dolazi do porasta koncentracije magnezija u krvnom serumu krava.
4. U suhostaju i ranoj laktaciji u mliječnim krava postoji značajna povezanost između koncentracije serumskog magnezija s jedne i kolesterola, ukupnih lipida i HDL, s druge strane.
5. Značajna pozitivna korelacija između koncentracija magnezija i masnih tvari u serumu ukazuje na povezanost metabolizma masnih tvari i magnezija u mliječnim krava.
6. Povezanost između magnezija i metabolizma masnih tvari u krava odraz je prvenstveno promjena u koncentraciji kolesterola u HDL-frakciji, što se zaključuje iz visokog stupnja njihove međusobne korelacije.
7. Povezanost između magnezija i metabolizma masnih tvari u krava sličnog je karaktera kao i u ostalih dosada istraživanih vrsta, što se zaključuje usporedbom s literaturnim podacima.
8. Budući da korelacijskom analizom podataka nije moguće dokazati izravni mehanizam navedene povezanosti, već samo njezino postojanje, to ukazuje na potrebu daljnjih istraživanja vezanih uz ovo područje.

Popis literature

AGUS, Z. S. (1999): Hypomagnesemia. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 1616-1622.

ALTURA, B. T., M. BRUST, S. BLOOM, R. L. BARBOUR, J. G. STEMPAK, B. M. ALTURA (1990): Magnesium dietary intake modulates blood lipid levels and atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 1840-1844.

BEITZ, D. C. (2004): Lipid Metabolism. In: *Dukes' Physiology of Domestic Animals*, 12th ed. (Rece, W. O., Ed.). Cornell University Press. Ithaca, London. pp. 516-534.

BRUSS, M. L. (1997): Lipids and Ketones. In: *Clinical biochemistry of domestic animals*, 5th ed. (Kaneko, J. J., J. W. Harvey, M. L. Bruss, Eds.). Academic Press. San Diego. pp. 83-115.

CHAO, Y. S., E. E. WINDLER, G. C. CHEN, R. J. RAVEL (1979): Hepatic catabolism of rat and human lipoproteins in rats treated with 17 α -ethinyl estradiol. *J. Biol. Chem.* 254, 11360-11366.

FEHILY, A. M., J. W. YARNELL, C. H. BOLTON, B. K. BUTLAND (1988): Dietary determinants of plasma lipids and lipoproteins: the Caerphilly Study. *Eur. J. Clin. Nutr.* 42, 405-413.

FILIPOVIĆ, N., Z. STOJEVIĆ, L. BAČAR-HUSKIĆ (2007): Energetski metabolizam u krava tijekom razdoblja rane laktacije. *Praxis Veterinaria* 55, 91-100.

FILIPOVIĆ, N., Z. STOJEVIĆ, B. BEER-LJUBIĆ, N. POLJIČAK-MILAS (2008): Der Fettstoffwechsel bei Holstein-Kühen in der Trockenstehzeit und zu Laktationsbeginn. *Tierärztl. Umschau* 63, 59-64.

FONTENOT, J. P., V. G. ALLEN, G. E. BUNCE, J. P. GOFF (1989): Factors influencing magnesium absorption and metabolism in ruminants. *J. Anim. Sci.* 67, 3445-3455.

FRANCONE, O. L., C. J. FIELDING (1991): Effects of site-directed mutagenesis at residues cysteine-31 and cysteine-184 on lecithin-cholesterol acyltransferase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 1716-1720.

GIBBONS, G. F. (2003): Regulation of fatty acid and cholesterol synthesis: co-operation or competition? *Prog. Lipid Res.* 42, 479-497.

GINSBERG, H. N. (1990): Lipoprotein physiology. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* 27, 503-519.

GOFF J. P., R. L. HORST (1997): Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.* 80, 1260-1268.

GOFF J. P. (2004): Minerals. In: *Dukes' Physiology of Domestic Animals*, 12th ed. (Rece, W. O., Ed.). Cornell University Press. Ithaca, London. pp. 575-599.

GOFF J. P. (2008): The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Vet. J.* 176, 50-57.

GUERRERO-ROMERO F., M. RODRIGUEZ-MORÁN (2002): Low serum magnesium levels and metabolic syndrome. *Acta Diabetol.* 39, 209-213.

GUERRERO-ROMERO F., M. RODRIGUEZ-MORÁN (2006): Hypomagnesemia, oxidative stress, inflammation, and metabolic syndrome. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 22, 471-476.

GUEUX, E., V. AZAIS-BRAESCO, L. BUSSIÉRE, P. GROLIER, A. MAZUR, Y. RAYSSIGUIER (1995): Effect of magnesium deficiency on triacylglycerol-rich lipoprotein and tissue susceptibility to peroxidation in relation to vitamin E content. *Br. J. Nutr.* 74, 849-856.

HOLTENIUS, P. (1989): Plasma lipids in normal cows around parturition and in cows with metabolic disorders with and without fatty liver. *Acta Vet. Scand.* 30, 441-445.

HORST, R. L., J. P. GOFF, T. A. REINHARDT (2005): Adapting to the transition between gestation and lactation: differences between rat, human and dairy cow. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 10, 141-156.

KANEKO, J. J., W. HARVEY, M. L. BRUSS (1997): Appendixes. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 5th ed., (Kaneko, J. J., J. W. Harvey, M. L. Bruss, Eds). Academic Press, San Diego, pp. 885-905.

KIM, T. H., G. H. SUH (2003): Effect of the amount of body condition loss from the dry to near calving periods on the subsequent body condition change, occurrence of postpartum diseases, metabolic parameters and reproductive performance in Holstein dairy cows. *Theriogenology* 60, 1445-1456.

LUOMA, H., M. JAUHAINEN, P. ALAKUIJALA, T. NEVALAINEN (1998): Seven weeks feeding of magnesium and fluoride modifies plasma lipids of hypercholesterolaemic rats in late growth phase. *Magnes. Res.* 11, 271-282.

MA, T. S., T. YAMAMOTO, J. L. GOLDSTEIN, M. S. BROWN (1986): Increased mRNA for low density lipoprotein receptors in liver of rabbits treated with 17 α -ethinyl estradiol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 792-796.

MAHLEY, R. W., T. L. INNERARITY, S. C. RALL Jr, K. H. WEISGRABER (1984): Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J. Lipid. Res.* 25, 1277-1294.

McNAMARA, J. P., J. K. HILLERS (1986): Adaptations in lipid metabolism of bovine adipose tissue in lactogenesis and lactation. *J. Lipid Res.* 27, 150-157.

MURPHY, E. (2000): Mysteries of magnesium homeostasis. *Circ. Res.* 86, 245-248.

NASSIR, F., A. MAZUR, F. GIANNONI, E. GUEUX, N.O. DAVIDSON, Y. RAYSSIGUIER (1995): Magnesium deficiency modulates hepatic lipogenesis and apolipoprotein gene expression in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* 1257, 125-132.

OLATUNJI, L. A., A. O. SOLADOYE (2007): Increased magnesium intake prevents hyperlipidemia and insulin resistance and reduces lipid peroxidation in fructose-fed rats. *Pathophysiology* 14, 11-15.

RAYSSIGUIER, Y., E. GUEUX, D. WEISER (1981): Effect of magnesium deficiency on lipid metabolism in rats fed a high carbohydrate diet. *J. Nutr.* 111, 1876-1883.

RAYSSIGUIER, Y., L. NOÉ, J. ETIENNE, E. GUEUX, P. CARDOT, A. MAZUR (1991): Effect of magnesium deficiency on post-heparin lipase activity and tissue lipoprotein lipase in the rat. *Lipids* 26, 182-186.

REID, I. M. (1980): Incidence and severity of fatty liver in dairy cows. *Vet. Rec.* 107, 281-284.

ROSANOFF, A., M. S. SEELING (2004): Comparison of mechanism and functional effects of magnesium and statin pharmaceuticals. *J. Am. Coll. Nutr.* 23, 501S-505S.

ROSOL, T. J., C. C. CAPEN (1997): Calcium-Regulating Hormones and Diseases of Abnormal Mineral (Calcium, Phosphorus, Magnesium) Metabolism, In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 5th ed., (Kaneko, J. J., J. W. Harvey, M. L. Bruss, Eds). Academic Press, San Diego, pp. 619-702.

SCHAEFER, E. J., D. M. FOSTER, L. A. ZECH, F. T. LINDGREN, H. B. BREWER Jr, R. I. LEVY (1983): The effects of estrogen administration on plasma lipoprotein metabolism in premenopausal females. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 57, 262-267.

SCHULPIS, K. H., T. KARAKONSTANTAKIS, A. BARTZELIOTOU, G. A. KARIKAS, I. PAPANOTIRIOU (2004): The association of serum lipids, lipoproteins and apolipoproteins with selected trace elements and minerals in phenylketonuric patients on diet. *Clin. Nutr.* 23, 401-407.

SINGH, R. B., S. S. RASTOGI, V. K. SHARMA, R. B. SAHARIA, S. K. KULSHRETHA (1990): Can dietary magnesium modulate lipoprotein metabolism? *Magnes. Trace Elem.* 9, 255-264.

SRIVASTAVA, N., P. R. CHOWDHURY, M. AVERNA, R. A. K. SRIVASTAVA (2001): Estrogen increases hepatic lipase levels in inbred strains of mice: A possible mechanism for estrogen-dependent lowering of high density lipoprotein. *Mol. Cell. Biochem.* 220, 87-93.

TAINTURIER, D., J. P. BRAUN, A. G. RICO, J. P. THOUVENOT (1984): Variations in blood composition in dairy cows during pregnancy and after calving. *Res. Vet. Sci.* 37, 129-131.

TALL, A. R., Y. LANGE (1978): Interaction of cholesterol, phospholipid and apoprotein in high density lipoprotein recombinants. *Biochim. Biophys. Acta* 513, 185-197.

VEENHUIZEN, J. J., J. K. DRACKLEY, M. J. RICHARD, T. P. SANDERSON, L. D. MILLER, J. W. YOUNG (1991): 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.

VERNON, R. G. (2005): Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. *J. Dairy Res.* 72, 460-469.

WILLSON, V. J., K. F. TIPTON (1981): The activation of ox-brain NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase by magnesium ions. *Eur. J. Biochem.* 113, 477-483.

ZAMMIT, V. A. (1983): Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *Proc. Nutr. Soc.* 42, 289-302.

Sažetak

Iris Marinković: Povezanost metabolizma masnih tvari i magnezija u krava tijekom kasne gravidnosti i rane laktacije

Istražena su kretanja koncentracija ukupnog kolesterola, ukupnih lipida i lipoproteina velike gustoće (HDL) u serumu krava holštajnske pasmine tijekom razdoblja kasne gravidnosti i rane laktacije te njihova povezanost s kretanjem koncentracija magnezija. Uzorci za analizu uzimani su 14 dana prije teljenja (n=23), te 10. (n=19) i 30. (n=23) dana po teljenju (prvo, drugo i treće pokusno razdoblje). Koncentracija magnezija značajno je porasla u trećem u odnosu na drugo pokusno razdoblje ($p < 0,05$). Koncentracija kolesterola bila je značajno viša u trećem pokusnom razdoblju u odnosu na prvo i drugo ($p < 0,001$). Koncentracija ukupnih lipida bila je značajno viša u trećem pokusnom razdoblju u odnosu na prvo ($p < 0,01$) i drugo pokusno razdoblje ($p < 0,05$). Koncentracija HDL značajno je porasla u trećem u odnosu na prvo ($p < 0,001$) i drugo pokusno razdoblje ($p < 0,05$). Utvrđen je visoki stupanj pozitivne korelacije između koncentracija kolesterola, ukupnih lipida i HDL međusobno, te srednji stupanj pozitivne korelacije između koncentracije magnezija i ostalih istraživanih pokazatelja (od $p < 0,001$ do $p < 0,0001$). Rezultati istraživanja ukazuju na povezanost metabolizma magnezija s metabolizmom masti u krava, prvenstveno s koncentracijom kolesterola u frakciji HDL lipoproteina. Ova povezanost objašnjava se djelovanjem magnezija na aktivnost enzima ključnih za sintezu lipida i promet lipoproteina u krvi.

Ključne riječi: magnezij, lipidi, mliječne krave, gravidnost, laktacija

Summary

Iris Marinković: Relationship between lipid metabolism and magnesium in cows during late pregnancy and early lactation

Changes in the blood serum concentrations of total cholesterol (TC), total lipids (TL) and HDL in Holstein cows in the late pregnancy and early lactation were investigated as well as their connection with the changes in magnesium concentration. Samples were taken 14 days before (n=23), on day 10 (n=21) and on day 30 after calving (n=23) (first, second and third experimental period, respectively). The concentration of magnesium significantly increased in the third in comparison with the second period ($p<0,05$). The concentration of TC was significantly higher in the third in comparison with the first and second experimental period ($p<0,001$). The concentration of TL was significantly higher in the third compared with the first ($p<0,01$) and second period ($p<0,05$). Also, the concentration of HDL significantly increased in the third in comparison with the first ($p<0,001$) and second period ($p<0,05$). A significant high correlation between the concentrations of TC, TL and HDL and a significant medium correlation between magnesium and other investigated parameters was found ($p<0,001$ to $p<0,0001$). The results indicate the existence of a relationship between magnesium and lipid metabolism, especially with HDL-cholesterol, which is connected with magnesium effects on activity of key enzymes of lipogenesis and lipoprotein metabolism.

Key words: magnesium, lipids, dairy cows, pregnancy, lactation