

Streszczenie

W okresie okołoporodowym u krów mlecznych, a szczególnie w okresie przejściowym (zaczynającym się trzy tygodnie przed, a kończącym trzy tygodnie po porodzie) zachodzą specyficzne zmiany metaboliczne, związane z ciążą oraz rozpoczynającą się laktacją. Jednym z głównych wyzwań, przed którymi staje organizm krowy w tym czasie jest pokrycie rosnącego zapotrzebowania na energię dla macicy i rozwijającego się w niej płodu, a później dla gruczołu mlekowego, do produkcji laktozy mleka (Grummer, 1995). Paradoksalnie jednak przed porodem obserwuje się drastyczny spadek apetytu, którego konsekwencją jest zmniejszenie pobrania paszy oraz szybko pogłębiający się UBE (Bell, 1995; Doepel i in., 2002).

Fizjologiczne zmiany zachodzące w tym czasie w organizmie krowy muszą sprostać wysokiemu zapotrzebowaniu na energię. Adaptacja dotyczy przede wszystkim metabolizmu glukozy oraz tłuszczu i objawia się stymulacją procesu glukoneogenezy w wątrobie oraz intensywną lipolizą tkanki tłuszczowej.

Zwiększenie aktywności procesu glukoneogenezy jest odpowiedzią na gwałtowny wzrost zapotrzebowania na glukozę dla gruczołu mlekowego. Obniżenie pobrania paszy wpływa na zmniejszenie produkcji głównego prekursora glukozy, tj. kwasu propionowego. Proces glukoneogenezy musi dostosować się do wykorzystywania innych, dostępnych substratów glukogenicznych. Ważnymi prekursorami glukozy stają się aminokwasy glukogenne (przede wszystkim alanina i glutamina), kwas mlekowy oraz glicerol uwalniany z tkanki tłuszczowej. Towarzyszą temu zmiany ekspresji genów oraz aktywności kluczowych enzymów procesu glukoneogenezy, tj. PC i PEPCK, które są głównym punktem kontrolnym, regulującym proces endogennej produkcji glukozy w wątrobie (Greenfield i in., 2000; Hammon i in., 2009).

Mimo stymulacji procesu glukoneogenezy, ilość produkowanej endogennie glukozy, przy tak wysokim zapotrzebowaniu energetycznym nie jest wystarczająca. W wyniku charakterystycznych dla okresu okołoporodowego zmian hormonalnych organizm krowy uwalnia rezerwy energetyczne, zmagazynowane w postaci TAG w tkance tłuszczowej. Powstałe tym sposobem WKT są dostarczane żyłą wrotną do wątroby, gdzie następuje ich intensywny metabolizm. Jego celem jest uzyskanie alternatywnych źródeł energii, które zostaną wykorzystane przez wątrobę i tkanki obwodowe, co umożliwi oszczędzanie powstałej endogennie glukozy dla gruczołu mlekowego (Drackley i in., 2001). Ilość WKT, które

dostarczane są do wątroby, przekracza jednak jej zdolność do ich utlenienia. Nadmiar WKT ulega powtórnej estryfikacji do TAG i w postaci VLDL powinien zostać przetransportowany do tkanek obwodowych (Bauchart i in., 1996; Gross i in., 2013).

Chociaż krowy mleczne mają zdolność do mobilizowania znacznych ilości rezerw tłuszczowych, wydaje się, że wątroba nie jest gotowa na napływ dużych ilości WKT. W okresie wczesnej laktacji obserwuje się spadek syntezy i sekrecji VLDL, co w warunkach wzmożonej lipolizy, jest zjawiskiem paradoksalnym. Zdaniem Ametaj (2005) niska synteza VLDL jest głównym czynnikiem prowadzącym do odkładania tłuszczu w wątrobie, negatywnie wpływając na jej funkcje i zachodzące w niej szlaki metaboliczne.

Jak podają Bernabucci i in. (2004, 2009) za deficyt VLDL odpowiedzialne jest zmniejszenie ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę głównych składników tej cząsteczki, tj. apo B100 i MTTP. Zdaniem Liu i in. (2014) oraz Basirico i in. (2011) intensywna lipoliza tkanki tłuszczowej w okresie okołoporodowym, i związane z nią zwiększenie cyrkulacji WKT i BHBA we krwi, mogą zmniejszać ekspresję mRNA tych białek. Mechanizm powodujący obniżenie ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę składników VLDL w tym czasie nie został jednak dokładnie poznany.

W związku z wysokim ryzykiem wystąpienia zaburzeń metabolicznych i infekcyjnych, będących konsekwencją zachwiania równowagi energetycznej organizmu w okresie okołoporodowym, bardzo ważna jest prewencja chorób, a także prawidłowe żywienie, które dostarczy odpowiednią ilość składników pokarmowych (w tym także energii) oraz substratów do produkcji glukozy. Ze względu na trudności w przezwyciężeniu spadku apetytu i związanego z nim UBE żywienie krów wysoko wydajnych w okresie okołoporodowym jest dużym wyzwaniem. Poszukuje się więc rozwiązań, które wspomogą organizm krowy przez dostarczenie dodatkowego źródła energii lub odpowiednich substratów do jej produkcji.

Zmiany metabolizmu glukozy oraz tłuszczu, tj. stymulacja procesu glukoneogenezy, intensywny metabolizm WKT oraz produkcja lipoprotein, zachodzą w wątrobie. Poprawa jej funkcjonowania ma biologiczne znaczenie. Usprawnienie funkcji wątroby, ze względu na procesy biochemiczne w niej zachodzące, jest konieczne do prawidłowej adaptacji całego organizmu w okresie okołoporodowym. Jedną ze strategii, mającej na celu poprawę metabolizmu wątroby jest stosowanie dodatków glukogenicznych. Podaż G i GP jest skutecznym sposobem łagodzenia niedoborów glukozy, a także UBE i jego negatywnych konsekwencji. W okresie ich stosowania obserwuje się poprawę statusu energetycznego krów

oraz zmniejszenie mobilizacji tkanki tłuszczowej, a także niższy poziom akumulacji TAG w wątrobie (DeFrain i in., 2004; Donkin i in., 2009; Carvalho i in., 2011).

Korzystne działanie G oraz GP na organizm krowy w okresie okołoporodowym zostało potwierdzone wynikami licznych badań. Jednak mimo wielu doświadczeń w tym zakresie, dokładny mechanizm ich działania nie został poznany. Problematyka prezentowanej pracy doktorskiej jest więc nowatorska. W powyższej pracy podjęto próbę poznania mechanizmów działania G oraz GP i ich wpływu na procesy biochemiczne związane z metabolizmem glukozy i tłuszczu, zachodzące w wątrobie krów mlecznych.

Celem doświadczenia było określenie wpływu dodatków glukogenicznych, tj. G lub GP, podawanych w zróżnicowanych dawkach w postaci wlewów doprzelykowych, na aktywność kluczowych enzymów procesu glukoneogenezy, tj. PC i PEPCK oraz na ekspresję wybranych genów związanych z metabolizmem glukozy oraz tłuszczu w wątrobie krów w okresie okołoporodowym (PC, PEPCK-C, PEPCK-M, apo B100 oraz MTTP).

Doświadczenie zostało przeprowadzone na 30 krowach rasy HF, pochodzących z obory należącej do Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu. Zwierzęta były objęte doświadczeniem od 21 dnia przed spodziewanym porodem do 28 dnia po porodzie. Zwierzęta rozdzielono metodą analogów do pięciu grup doświadczalnych (po 6 zwierząt w grupie), tj.: 1) otrzymującej wodę w ilości 450 ml/dzień (W450); 2) glicerol w ilości 450 ml/dzień (G450); 3) glicerol w ilości 900 ml/dzień (G900); 4) glikol propylenowy w ilości 450 ml/dzień (GP450); 5) glikol propylenowy w ilości 900 ml/dzień (GP900). Procedury badań na zwierzętach zostały zaakceptowane przez 1 Lokalną Komisję Etyczną (zezwozenie NO. 99/2009 z dnia 22.10.09).

Pobranie SM rejestrowano codziennie, indywidualnie dla każdej krowy przy pomocy systemu elektronicznego monitoringu RIC (Insentec B.V., Holandia). Próbkę wszystkich pasz wchodzących w skład dawek pokarmowych pobierano raz w miesiącu i wraz z próbkami zbiorczymi TMR oraz próbkami zbiorczymi niedojadów poddawano analizie chemicznej w laboratorium Katedry Żywienia i Dietetyki Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie w celu oznaczenia zawartości SM, popiołu surowego, białka ogólnego, NDF, ADF oraz skrobi.

Próby krwi pobierane były z żyły jarzmowej w 7. dniu przed spodziewanym porodem, oraz w 3. i 21. dniu po porodzie. Analizy krwi wykonywane były w celu oznaczenia poziomu glukozy, insuliny, WKT, BHBA oraz TAG.

Biopsje wątroby wykonywane były w 7. dniu przed spodziewanym porodem oraz w 3. i 21. dniu po porodzie (w każdym z dni dwa razy: w godzinę i w dwie godziny po

zadaniu dodatku), wg procedury opisanej przez Hammon i in. (2009) oraz Rabelo i in. (2005). W pobranym materiale oznaczono aktywność enzymatyczną PC i PEPCK oraz ekspresję mRNA PC, PEPCK-C, PEPCK-M, apo B100 oraz MTTP.

Analizę aktywności enzymatycznej wykonano w laboratorium Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN) w Dummerstorf w Niemczech. Pomiarów aktywności dokonano metodą z wykorzystaniem izotopowego znakowania produktów powstałych w reakcji enzymatycznej z użyciem izotopu ^{14}C (Steinhoff-Wagner i in., 2011).

Fragmenty wybranych genów, tj. PC, PEPCK-C, PEPCK-M, apo B100 oraz MTTP, amplifikowano w reakcji PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) przy użyciu zaprojektowanych starterów i sond TaqMan. Jako gen referencyjny wybrano RPS9 (Janovick-Guertzy i in., 2007; Ostrowska i in., 2014).

Wyniki poddano analizie statystycznej, przy użyciu procedury MIXED pakietu statystycznego SAS (2002). Wyniki interpretowano w oparciu o zaplanowane kontrasty (efekt dodatku paszowego: W450 vs GP; W450 vs G, G vs GP; G450 vs G900; GP450 vs GP900; efekt dnia pomiaru: liniowy i kwadratowy kontrast wielomianowy), wykonane przy użyciu procedury CONTRAST.

Część G i GP unika fermentacji w żwaczu i po wchłonięciu w jelitach, żyłą wrotną dostaje się bezpośrednio do wątroby, gdzie wchodzi w proces glukoneogenezy: GP jest przekształcany w kwas pirogronowy, który ulega konwersji do szczawiooctanu, a G jest przekształcany w aldehyd-3-fosfoglicerynowy. Hipoteza badawcza pracy zakładała, że skoro GP wchodzi w proces glukoneogenezy w początkowym etapie, jego długie przejście przez cały szlak procesu związane będzie z większym zaangażowaniem kluczowych enzymów, tj. PC i PEPCK. Wyniki powyższego doświadczenia potwierdziły przyjętą hipotezę badawczą. Wykorzystanie GP w procesie glukoneogenezy wymagało większej aktywności enzymów kluczowych dla tego procesu, tj. PC i PEPCK. Ponadto wykorzystanie większej dawki GP wymagało zwiększenia ekspresji genów odpowiedzialnych za ich syntezę.

Tak jak zakładano, wlewy doprzętykowe G lub GP, poprzez zmiany w statusie metabolicznym krwi, miały wpływ także na ekspresję genów kodujących syntezę apo B100 oraz MTTP w wątrobie krów mlecznych. Mniejsza dawka G i GP zwiększyła ekspresję mRNA apo B100. Obydwa dodatki, niezależnie od wielkości dawki, zwiększyły ekspresję genu kodującego MTTP w wątrobie zwierząt doświadczalnych.

Obserwowane w poszczególnych dniach okresu okołoporodowego zmiany w aktywności kluczowych enzymów procesu glukoneogenezy, tj. PC i PEPCK, a także w ekspresji wybranych genów, tj. PC, PEPCK-C, PEPCK-M, apo B100 oraz MTTP

w wątrobie, potwierdziły że w organizmie krowy następują zmiany w metabolizmie glukozy oraz tłuszczu, będące odpowiedzią na wzrastające w okresie okołoporodowym zapotrzebowanie energetyczne.