

**Juoksutusmahaan infusoidun rasvalisän vaikutus  
ummessaolevien lehmien insuliiniresistenssiin**

Milla Kuitunen  
Maisterin tutkielma  
Maataloustieteiden laitos  
Kotieläintiede  
Maaliskuu 2010

HELSINGIN YLIOPISTO — HELSINGFORS UNIVERSITET — UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty		Laitos — Institution — Department	
Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Maataloustieteiden laitos	
Tekijä — Författare — Author Milla Kuitunen			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Juoksutusmahaan infusoidun rasvalisän vaikutus ummessaolevien lehmien insuliiniresistenssiin			
Oppiaine — Läroämne — Subject Kotieläinravitseminen			
Työn laji — Arbetets art — Level	Aika — Datum — Month and year	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages	
Maisterin tutkielma	Maaliskuu 2010	41	
<p>Lypsylehmän insuliiniresistenssi on lopputiineyteen ja alkulaktaatioon liittyvä sopeutumismekanismi, jolla lehmä säästää veren glukoosin kehittyvän sikiön ja maitorauhasen käyttöön. Lihavuus, korkeatuotostaso ja ummessaoloajan ylikuokinta voimistavat poikimisen jälkeistä insuliiniresistenssiä. Voimistuneeseen insuliiniresistenssiin liittyy lisääntynyt poikimisen jälkeisten aineenvaihduntasairauksien riski. Ihmisillä ja rotilla tehtyjen tutkimusten perusteella monityydyttymättömien rasvahappojen saannin lisääminen on ehkäissyt insuliiniresistenssin kehittymistä. Pellavaöljyinfuusion on todettu heikentävän ei-tiineiden ummessaolevien lehmien insuliiniresistenssiä, mutta camelinaöljyn vaikutusta lehmien insuliiniresistenssiin ei ole aiemmin tutkittu. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, kuinka ummessaoloaikana tiineille lehmille juoksutusmahaan infusoitu camelinaöljy ja tali vaikuttavat lehmien insuliiniresistenssin kehittymiseen. Tali on nautaan omaa rasvaa, joten se soveltuu rasvahappokoostumukseltaan mallintamaan kudoksista mobilisoituvaa rasvaa.</p> <p>Tutkimus tehtiin Viikin opetus- ja tutkimustilan navetassa 15.9.-14.10. 2008. Koe suoritettiin toistettuna 3 x 3 latinalaisen nelion kokeena viiden päivän koejaksoilla, joiden välissä oli viiden päivän tauko. Koekäsittelyinä lehmien juoksutusmahaan infusoitiin camelinaöljyä tai talia. Kontrollikäsittelyinä juoksutusmahaan infusoitiin vettä. Infuusioiden suoritettiin pötsifistelistä juoksutusmahaan vievällä letkulla. Kokeeseen osallistuvat lehmät olivat toista kertaa poikivia pötsifistelöityjä ayshirelehmäitä. Lehmien ruokinta oli rajoitettu kokeen ajaksi 95 %:iin laskennallisesta energian tarpeesta. Lehmien ruokinta koostui heinä-nurmisäilörehuseoksesta sekä ummessaoloajan kivennäisestä. Rasvainfuusioiden päivittäinen annos oli 430 g (500 ml), joka annosteltiin 50 ml erissä kahden tunnin välein 10 kertaa päivässä. Koejakson viidentenä päivänä lehmille tehtiin glukosirasituskoe ja insuliinivastekoe insuliiniresistenssin arvioimiseksi. Glukosirasituskokeen ja insuliinivastekokeen tulokset analysoitiin SAS:n mixed- ja NLIN-ohjelmilla</p> <p>Rasvakäsittelyt nostivat odotetusti veren vapaiden rasvahappojen (NEFA) pitoisuutta. Rasvakäsittelyt madalsivat insuliinin perustasoa, mutta käsittelyillä ei ollut vaikutusta glukoosin perustasoon. Glukosirasituskokeessa rasvakäsittelyt hidastivat glukoosin poistumisnopeutta ja pidensivät glukoosin puoliintumisaikaa. Insuliinivastekokeessa rasvakäsittelyt hidastivat glukoosin poistumisnopeutta, pidensivät glukoosin puoliintumisaikaa ja suurensivat glukoosin pitoisuus-aika käyrän alle jäävän alueen pinta-alaa. Tulosten perusteella sekä talilla että camelinaöljyllä on lehmien insuliiniresistenssiä voimistava vaikutus. Insuliinivastekokeessa camelinaöljy hidasti insuliinin poistumisnopeutta ja pidensi insuliinin puoliintumisaikaa taliin verrattuna. Muiden tulosten osalta camelinaöljyn vaikutus ei eronnut talikäsittelyn vaikutuksesta. Camelinaöljyllä ei ollut insuliiniresistenssin kehittymistä ehkäisevää vaikutusta, mikä on osittain ristiriidassa aiempien tyydyttymättömiä rasvahappoja ja insuliiniresistenssiä tutkivien kokeiden kanssa. Tämä tutkimus kuten aiemmatkin tutkimukset vahvistavat, että korkea veren NEFA-pitoisuus voimistaa lehmien insuliiniresistenssiä.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords Insuliiniresistenssi, rasvaruokinta, ummessaoloaika			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Kotieläintieteen laitoksen kirjasto			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Lypsylehmän metabolinen stressi tutkimushanke Tutkijat: Tuomo Kokkonen, Aila Vanhatalo, Kari Elo, Siru Salin ja Juhani Taponen Työn ohjaajat: Tuomo Kokkonen ja Siru Salin			

## Sisällys

1. Johdanto.....	1
2. Aineisto ja menetelmät .....	6
2.1 Koe-eläimet ja koejärjestelyt .....	6
2.2 Näytteenotto ja näytteiden käsittelyt .....	8
2.3 Tilastollinen analysointi .....	11
3. Tulokset .....	13
3.1 Lehmien rehun syönti ja rehun laatu .....	13
3.2 Glukoosirasituskokeen tulokset.....	15
3.3 Insuliinivastekokeen tulokset .....	19
4. Tulosten tarkastelu.....	22
4.1 Syönnin vaikutus kokeen tuloksiin.....	22
4.2 Insuliinin, glukoosin ja NEFA:n perustasot .....	23
4.3 Rasvainfuusioiden vaikutus insuliiniresistenssiin glukoosirasituskokeessa.....	25
4.4 Rasvainfuusioiden vaikutus insuliiniresistenssiin insuliinivastekokeessa .....	28
4.5 Rasvainfuusioiden vaikutus antilipolyyttiseen vasteeseen .....	32
5. Yhteenveto ja johtopäätökset.....	34
Kirjallisuus .....	36

## Taulukot

Taulukko 1. Ravintoaineiden sulavuudet .....	13
Taulukko 2. Säilörehun ja heinän kemiallinen koostumus.....	14
Taulukko 3. Glukoosirasituskokeen tulokset.....	18
Taulukko 4. Insuliinivastekokeen tulokset. ....	20

## Kuviot

Kuvio 1. Plasman insuliinipitoisuuden muutokset glukoosirasituskokeessa. ....	17
Kuvio 2. Plasman NEFA-pitoisuuden muutokset glukoosirasituskokeessa.....	17
Kuvio 3. Plasman NEFA-pitoisuuden muutokset insuliinivastekokeen aikana. ....	21
Kuvio 4. Glukoosipitoisuuden muutokset glukoosirasituskokeessa. ....	25
Kuvio 5. Insuliinipitoisuuden muutokset insuliinivastekokeessa.....	29
Kuvio 6. Glukoosipitoisuuden muutokset insuliinivastekokeessa. ....	29
Kuvio 7. Camelinäkäsittelyn vaikutus yksittäisten lehmien NEFA-pitoisuuden muutoksiin insuliinivastekokeessa. ....	32

## 1. Johdanto

Lypsylehmiä tuotoksen lähtiessä kasvamaan 1950-luvulla suurimmaksi ongelmaksi lypsylehmiä ruokinnassa muodostui lehmien riittävän energian saannin turvaaminen poikimisen jälkeen, jotta säästyttiin ketoosilta. Nykyään asetonitauti eli ketoosi on harvinaista tehostuneen poikimisen jälkeisen väkirehuruokinnan ja säilörehun laadun parantumisen ansiosta. Sen sijaan lehmiä ruokitaan jopa liiankin voimakkaalla ruokinnalla ummessaoloaikana. Ruokinnan rajoittamista vaikeuttaa pihattonavettojen vapaa seosrehuruokinta. Lypsylehmiä metabolialle poikimisen jälkeen maidontuotantoon sopeutuminen on edelleen haasteellista. Jalostusvalinnan ansiosta lehmät mobilisoivat aiempaa tehokkaammin rasva- ja lihaskudoksiaan maidon tuotantoon, vaikka poikimisen jälkeiseen lehmiä osataan ruokkia nykyään energiarikkailla dieeteillä.

Erityisesti lehmän sopeutumista korkeaan tuotostasoon vaikeuttaa lehmän mahdollinen lihavuus tai ummessaoloajan ylikuokinta, mikä johtaa voimakkaampaan rasvojen mobilisaatioon poikimisen jälkeen (Holtenius ym. 2003). Liian korkealla ummessaoloajan ruokintatasolla on todettu olevan yhteys insuliiniresistenssin voimistumiseen (Holtenius ym. 2003). Insuliiniresistenssillä tarkoitetaan, että normaali insuliinipitoisuus tuottaa normaalia matalamman biologisen vasteen (Kahn 1978). Lypsylehmiä insuliiniresistenssi kuuluu tärkeänä osana lehmän normaaliin alkulaktaatioon sopeutumisessa. Voimistunut insuliiniresistenssi puolestaan on yhteydessä poikimisen jälkeisten aineenvaihduntasairauksien sekä hedelmällisyshäiriöiden lisääntymiseen (Bigner ym. 1996, Opsomer ym. 1999, Holtenius ym. 2000, Roche 2006).

Lypsylehmiä insuliiniresistenssi alkaa kehittyä tiineyden loppupuolella, jotta glukoosi säästyy kasvavan sikiön käyttöön (Bell ja Bauman 1997). Rasva- ja lihaskudoksen insuliiniherkkyys laskee ja poikimisen lähestyessä rasvakudos muuttuu lähes täysin insuliinille resistentiksi, jotta suurin osa kehon glukoosista säästyy maitorauhasen maidon laktoosin tuotantoon. Lihavuuden lisäksi korkean tuotostason on osoitettu liittyvän poikimisajan voimistuneeseen insuliiniresistenssiin, jolloin normaali alkulaktaation sopeutumismekanismi toimii ylikorostuneesti.

Taipumus insuliiniresistenssille saattaa olla osittain periytyvää, sillä vastasyntyneille vasikoille tehdyn glukoosirasituskokeen mukaan Holsteinrodun vasikoilla insuliiniherkkyys on heikompi kuin liharotuisilla vasikoilla (Bossaert ym. 2008). Vastaavasti suurempaan maitotuotukseen jalostetuilla Pohjois-Amerikan Holsteinrodulla havaittiin tuotoskauden keskivaiheessa tehdyn glukoosirasituskokeen aikana hitaampi glukoosin poistuminen kuin vähemmän maitoa tuottavilla Uuden Seelannin Holstein-friisiläisillä (Patton ym. 2009).

Lypsylehmien voimistuneella insuliiniresistenssillä ja ihmisten tyyppin 2 diabeteksellä on yhteisiä taustatekijöitä, mutta lehmien insuliiniresistenssin on havaittu ilmenevän voimakkaammin juuri rasvakudoksessa, eivätkä insuliiniresistenssin muutokset niinkään näy hiilihydraattimetaboliassa (Hayirli ym. 2002). Insuliinihormonin keskeisimpiä tehtäviä ovat glukoosin käytön lisääminen lihas- ja rasvasoluissa, lipolyysin inhibointi ja lipogeneesin stimulointi sekä glukoneogeneesin säätely (Hayirli 2006, Muniyappa ym. 2008). Insuliini vaikuttaa täten lihas- ja rasvakudoksen aineenvaihdunnan lisäksi myös maksan toimintaan. Insuliinin toiminta välittyy soluihin solukalvon insuliinireseptorien ja reseptoreiden jälkeisten soluviestinnän kautta. Insuliiniresistenssin, joka ilmenee insuliiniherkkyyden tai insuliinivasteen heikentymisenä, taustalla voivat täten olla insuliinireseptorien määrän muutokset kohdesoluissa, reseptorien jälkeisen soluvälityksen muuttuminen sekä insuliinin erityksen ja poistumisen muutokset.

Korkean veren vapaiden rasvahappojen (NEFA) pitoisuuden on havaittu olevan yhteydessä insuliiniresistenssin voimistumiseen. Holteniuksen ym. (2003) tutkimuksen mukaan voimakkaammin rasvaa mobilisoivat, ummessaoloaikana ylikuokitut lehmät kärsivät voimakkaamasta insuliiniresistenssistä 3 viikkoa poikimisesta kuin vähemmän rasvaa mobilisoivat, rajoitetusti ummessaoloaikana ruokitut lehmät. Keskilaktaatiossa heinä-maissi säilörehuun lisätty hydrolysoitu eläinrasva nosti lehmien veren NEFA-pitoisuutta ja heikensi lehmien insuliiniherkkyttä ja insuliinivastetta (Palmquist ja Moser 1981). Rasvasoluilla tehdyissä viljelykokeissa on osoitettu, että kohonnut palmitiinihapon määrä häiritsee glukoosin kuljetusta ja aiheuttaa insuliiniresistenssin (Van Epps-Fung ym. 1997). Pires ym. (2007) osoittivat, että suoneen infusoitu tali voimisti insuliiniresistenssiä ei-tiineillä ummessaolevilla lehmillä.

Tyydyttyneiden rasvojen lisääntyneen saannin on ihmisillä, - kuten lehmilläkin, osoitettu aiheuttavan insuliiniresistenssin (Xiao ym. 2006). Monityydyttymättömien rasvahappojen, ja erityisesti eikosapentaeenihapon (EPA) ja dokosaheksaenihapon (DHA) lisääntynyt saanti taas on ehkäissyt insuliiniresistenssin kehittymistä ihmisillä (Clarke 2000, Delarue ym. 2006, Xiao ym. 2006). Hiirillä tehdyissä kokeissa erityisesti alfa-linoleenihapon (C18:3, n-3) syöttö on parantanut lihavuusgeeniä kantavien hiirien insuliiniherkkyyttä, mutta kalaöljyn tyyppisillä rasvahapoilla EPA:lla ja DHA:lla ei ole ollut vastaavaa vaikutusta (Mustad ym. 2006). Omega-3-rasvahappojen insuliiniherkkyyttä parantavan vaikutuksen ajatellaan perustuvan niiden solukalvojen fosfolipidirakenteita pehmentävään vaikutukseen (Storlien ym. 1991, Clarke 2000, Mustad ym. 2006). Erityisesti alfa-linoleenihappo saattaa muuttaa solukalvot mahdollisimman suotuisaan muotoon insuliinin toiminnan kannalta (Mustad ym. 2006).

Lisäämällä monityydyttymättömiä rasvahappoja eläinten rehuihin ja ihmisten ruokaan ei ole täysin pystytty osoittamaan, että monityydyttymättömät rasvahapot parantaisivat tyypin 2 diabetesta tai ehkäisisivät insuliiniresistenssin kehittymistä. Storlienin ym. (1991) mukaan rottien insuliiniresistenssin syntymistä pystytään ennalta ehkäisemään omega-3-rasvahappolisillä, mutta ei parantamaan jo kehittyneitä insuliiniresistenssiä. Steinin ym. (1997) rotan haimasoluilla tehdyn rasvahappoaltistuksen mukaan insuliiniresistenssiin voidaan vaikuttaa erityisesti yksittäisillä rasvahapoilla. Keskipitkä- ja pitkäketjuiset tyydyttyneet C16:0- ja C18:0-rasvahapot lisäävät lyhytketjuisiin ja tyydyttymättömiin rasvahappoihin verrattuna enemmän haimasolujen insuliinin eritystä (Stein ym. 1997). Gao ym. (2004) osoittivat, että C18:0, C18:1 ja C18:2 aiheuttivat insuliiniresistenssiin johtavan reaktioketjun rasvasoluissa. Barrèsin ym. (2009) koko genomin kattavan metyloitutkimuksen mukaan palmitiinihapolla (C16:0) aikaan saadaan vastaavanlainen geenitason muutos terveissä lihassoluissa, joka tyyppillisesti esiintyy tyypin 2 diabetesta sairastavien ihmisten lihassoluissa. Syötettäessä eläimille öljylisiä täytyykin huomioda kaikki öljyn sisältämät rasvahapot, sillä öljylisän fysiologiseen tehokkuuteen vaikuttavat omega-3 rasvahappopitoisuuden ohella myös muut öljyn sisältämät rasvahapot.

Monityydyttymättömien rasvahappojen vaikutusta insuliiniresistenssiin on tutkittu myös naudoilla. Yleensä rasvahapot syötetään märehitijöille tutkimuksissa suojattuna rasvana tai infusoidaan suoraan ohutsuoleen tai juoksutusmahaan pötsihajotuksen ja biohydrogenaation estämiseksi. Pellavaruokintaa on tähän asti eniten tutkituin lehmien monityydyttymättömien rasvahappojen lähde. Pellavansiemen ja siitä puristettu pellavaöljy ovat hyviä alfa-linoleenihapon lähteitä. Pellavaöljy sisältää naudan taliin verrattuna erityisen paljon C18:3- ja C18:2-rasvahappoja (Pires ym. 2008). Piresin ym. (2008) tutkimuksessa juoksutusmahaan infusoitu pellavaöljy paransi erityisesti ei-tiineiden ummessa olevien lehmien rasvakudoksen insuliiniherkkyyttä tali-infuusioon verrattuna. Pellavansiemenruokinta 50 tai 100 päivää poikimisen jälkeen ei sen sijaan vaikuttanut lehmien insuliiniresistenssiin (Cummins ja Sartin 1985). Häirillä lihasten insuliiniherkkyyden havaittiin parantuvan infusoidaessa juoksutusmahaan runsaasti omega-3-rasvahappoja sisältävää kalaöljyä (Gingras ym. 2007).

Monityydyttymättömien rasvahappojen saannin lisääminen ummessaolevien tiineiden lehmien rehuun saattaa vaikuttaa lypsylehmien insuliiniresistenssin kehittymiseen. Tavoitteena tässä rasvainfuusiokokeessa oli selvittää, miten juoksutusmahaan infusoitu tali ja camelinaöljy vaikuttaa insuliiniresistenssin kehittymiseen ummessaolevilla lypsylehmillä. Camelinaöljy on pellavaöljyn ohella hyvä alfa-linoleenihapon lähde. *Camelina sativasta* puristettu camelinaöljy sisältää 39 % monityydyttymättömiä omega-3-rasvahappoja (ALA) ja 15 % monityydyttymättömiä omega-6-rasvahappoja (Raisio 2009). *Camelina sativan* eli ruistankion viljely on lisääntynyt uudelleen siitä eristettävien kasvistanolien vuoksi. Tässä tutkimuksessa päädyttiin monityydyttymättömien rasvahappojen ja alfa-linoleenihapon lähteenä käyttämään camelinaöljyä ummessaoleville tiineille lypsylehmille. Camelinaöljyn vaikutusta lehmien insuliiniresistenssiin ei ole aiemmin tutkittu.

Tali on naudan omaa rasvaa ja se sopii täten parhaiten mallintamaan kudosasvojen hajotusta. Talia on käytetty nostamaan plasman NEFA-pitoisuutta esimerkiksi Piresin ym. (2007) ja Piresin ym. (2008) kokeissa sekä tässä rasvainfuusiokokeessa. Tali koostuu pääosin tyydyttyneistä C16-(25 %) ja C18-(15 %)rasvahapoista sekä monityydyttymättömästä C18:1-rasvahaposta (44 %) (Pires ym. 2008).

Tämän tutkimuksen hypoteesina on, että juoksutusmahaan infusoitu tali lisää perifeeristen kudosten insuliiniresistenssiä. Juoksutusmahaan infusoidun camelinaöljyn oletetaan muuttavan lehmän perifeeriset kudokset insuliinille herkemmiksi taliin verrattuna. Poikimisen jälkeisen insuliiniresistenssin lieventymisen myötä lehmien sopeutuminen laktaatioon helpottuisi, jolloin myös poikimisen jälkeisten aineenvaihduntasairauksien riski vähenisi.

Rasvainfuusioiden vaikutusta insuliiniresistenssiin ei ole aiemmin tutkittu tiineiden ummessaolevien lehmien ruokinnassa. Tutkimuksessa yritetään myös mallintaa ummessaolevilla tiineillä lehmillä poikimisen jälkeistä rasvakudoksen lipolyysiä nostamalla veren NEFA-pitoisuutta rasvainfuusioilla. Jos tyydyttymättömien rasvahappojen saannin lisääminen lieventää ummessaoloajan insuliiniresistenssiä, tyydyttymättömillä rasvahappolisillä, esimerkiksi syötettynä kalsiumsuoloihin sidottuna, voi olla myös mahdollista lieventää poikimisen jälkeen havaittua insuliiniresistenssiä. Tämä tutkimus on osa lypsylehmän metabolista stressiä tutkivaa hanketta, jonka yhtenä tavoitteena on löytää nykyaikaiseen pihattonavettaan soveltuva ummessaoloajan ruokintamalli.



## 2. Aineisto ja menetelmät

### 2.1 Koe-eläimet ja koejärjestelyt

Rasvainfuusiokoe järjestettiin Viikin opetus- ja tutkimustilan navetassa 15.9.2008 - 14.10.2008 välisenä aikana. Koe järjestettiin kahtena kolme kertaa kolme latinalaisen neliön kokeena. Koekäsittelyinä olivat camelinaöljy- ja tali-infusiot sekä kontrollikäsittelynä vesi-infuusio. Koe-eläiminä oli kuusi ummessaolevaa, toista kertaa poikivaa ayshire-rotuista lehmää. Koe alkoi keskimäärin 45 päivää ennen odotettua poikimista. Koesuunnitelman mukaisesti kokeen loputtua lehmillä oli aikaa poikimiseen keskimäärin 15 päivää. Viisi kuudesta lehmästä poiki ennen odotettua poikimispäivää, joten lehmät poikivat 13 - 23 päivää kokeen päättymisen jälkeen. Kaikille kuudelle lehmälle oli leikattu pötsifisteli keväällä 2008. Koejakson pituus oli viisi päivää, jonka jälkeen koe-eläimillä oli viiden päivän tauko kokeesta. Ensimmäisen neliön lehmien koetauon aikana kokeessa olivat toisen neliön eläimet. Molempien neliöiden ensimmäisen koejakson alussa arvottiin, missä järjestyksessä eläimet läpi käyvät koe- ja kontrollikäsittelyt.

Koelehmille asennettiin kokeen alkua edeltävänä päivänä pötsifistelistä juoksutusmahaan johtava PVC-letku. Letkun päähän oli asennettu painoksi kuulalaakereilla ja hiekalla täytetty muovipullo, jolla varmistettiin letkun paikallaan pysyminen juoksutusmahassa. Koekäsittelyinä koelehmille infusoitiin 10 kertaa päivässä juoksutusmahaan camelinaöljyä tai talia. Rasvainfuusiot annettiin kahden tunnin välein kello 6 - 24.00 välisenä aikana eli kello 6:00, 8:00, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00, 18:00, 20:00, 22:00 ja 24:00. Koejakson viidentenä päivänä kello 10 infuusio jätettiin välistä glukosirasituskokeen takia ja saman päivän viimeinen infuusio annettiin kello 18 ennen insuliinivastekokeen alkua.

Kontrollikäsittelynä juoksutusmahaan infusoitiin 43 - 45 °C jäädytettyä keitettyä vesijohtovettä. Keitetty vesi säilytettiin lämpökaapissa 50 °C. Talia pidettiin sulana rasva-infusioiden välillä lämpökaapissa (50 °C). Talin sulana pysyminen infuusion ajan varmistettiin pitämällä talia sisältävä infuusioruisku vesihautteessa (43 - 45 °C). Camelinaöljy otettiin kylmiöstä vesihauteeseen (43 - 45 °C) lämpiämään 15 minuuttia ennen jokaista infuusiota. Lehmien saaman rasvan kokonaisannos oli noin 430 g päivässä.

Vesi ja rasvainfuusiot tehtiin muovisilla 100 ml:n ja 50 ml:n ruiskuilla ja etanoli infusoitiin muovisilla 10 ml:n ruiskuilla. Infusoitaessa muoviruisku kiinnitettiin silikoniletkun pätkällä kiinni pötsifistelien korkissa olevaan messinkiseen liittimeen, johon juoksutusmahaan johtava letku oli kiinnitetty. Pötsifistelissä oleva liitin pidettiin suljettuna muovisella korkilla infuusioiden väliajat. Juoksutusmahaan johtavan letkun auki pysyminen varmistettiin infusoimalla letkuun rasvojen lisäksi aina myös lämmitettyä vettä ja 80 %:sta etanolia. Aluksi infusoitiin 50 ml:a vettä, jonka jälkeen infusoitiin 50 ml:a talia, camelinaöljyä tai vettä. Käsittelystä riippuen tali, camelinaöljy tai vesi huuhdottiin letkusta 50 ml:lla vettä ja 10 ml:lla etanolia. Infuusion lopuksi etanoli huuhdottiin 50 ml:lla vettä. Infuusioletkun paikallaan pysyminen tarkistettiin käsin pötsifistelien kautta kahdesti päivässä ennen kello 6 ja 18 infuusioita.

Kokeen ajan lehmät ruokittiin heinä-säilörehuseoksella ja ummessaoloajan kivennäisellä (Tunnu Melli Rehuraisio). Seosrehua oli tavoitteena syöttää 90 % lehmien laskennallisesta energian tarpeesta, mutta säilörehun odotettua paremman sulavuuden vuoksi energian saanti oli suurempaa. Lehmien energian tarve oli laskettu ummessaolevien lehmien ruokintasuositusten mukaisesti, jossa ylläpitoenergian tarve lasketaan elopainon mukaan ja energian tarpeeseen huomioidaan kahdeksannen tiineyskuukauden lisäenergian tarve (MTT Rehutaulukot ja ruokintasuositukset 2006). Seosrehu jaettiin kahdesti päivässä kello 7 ja 17 ja rehujätteen määrä mitattiin kerran päivässä. Kivennäisannos oli ohjeen mukaisesti 200 g päivässä ja se jaettiin kerran päivässä. Seosrehu koostui nurmisäilörehusta ja timoteivaltaisesta heinästä, joiden keskimääräinen koostumus näkyy taulukossa 2. Rehuseos valmistettiin sekoittamalla säilörehun joukkoon 20 % kuiva-aineesta kuivaa heinää. Lehmät punnittiin ennen kunkin jakson alkua kahtena peräkkäisenä päivänä.

## 2.2 Näytteenotto ja näytteiden käsittelyt

Kokeen aikana jokaisesta lehmille syötetystä säilörehu- ja heinäpaalista pakastettiin näyte rehuseoksen valmistuksen yhteydessä. Rehunäytteistä määritettiin pH, primaarinen ja sekundäärinen kuiva-aine, tuhka, raakarasva, raakavalkuainen, happodetergenttikuitu (ADF) sekä neutraalidetergenttikuitu (NDF). Säilörehunäytteistä analysoitiin myös maitohappo, haihtuvat rasvahapot, etanoli, pelkistävät sokerit, liukoinen typpi sekä ammoniumtyppi. Rehun sulavuuden arvioimiseksi lehmiltä kerättiin rektaalisesti sontanäytteet kahdesti päivässä. Kerätyt sontanäytteet pakastettiin ja koottiin jaksokohtaisiksi kokoomanäytteiksi.

Jokaisen koejakson neljäntenä päivänä iltapäivällä lehmät rauhoitettiin (Narcoxyl 1 - 1,5 ml) rasvakudosnäytteiden ottoa varten. Ennen rauhoitusta lehmiltä otettiin verinäyte maitosuonesta kahteen 10 ml etyleenidiamiinitetraetikkahapolla (EDTA) käsiteltyyn muoviputkeen. EDTA estää verinäytteiden hyytymisen. Jokaisen koejakson viidentenä päivänä otettiin verinäyte aamulla kello 6.30. Neljännen päivän illan ja viidennen päivän aamun verinäytteet kerättiin lehmien plasman glukoosi-, insuliini- ja NEFA-pitoisuuden alkutason määrittämiseen. Ennen rasvakudosnäytteiden ottoa rauhoitetuille lehmille asetettiin katetri kaulalaskimoon kaulan molemmille puolille helpottamaan insuliinivastekokeen ja glukoosirasituskokeen verinäytteiden keräämistä. Vasemman puoleinen katetri oli tarkoitettu ensisijaisesti insuliinin ja glukoosin infusointiin ja oikean puoleinen verinäytteiden keruuseen.

Jokaisen koejakson viimeisenä päivänä koelehmille tehtiin glukoosirasituskoe ja insuliinivastekoe. Glukoosirasituskoe aloitettiin jakson viidentenä päivänä aamulla kello 9.00. Tuntia ennen glukoosirasituskokeen alkua lehmiltä estettiin rehujen syönteä ja syönteä estettiin koko glukoosirasituskokeen ajaksi. Glukoosirasituskokeessa lehmille infusointiin katetrin, yleensä vasemman puolen isompi katetri, kautta suoneen 0,25 g glukoosia elopainokiloa kohti hypertonisena 300 mg/ml nesteliuoksena (Glucos b.Braun, Melsungen, Saksa). Glukoosin anto kesti keskimäärin 3 minuuttia. Glukoosirasituskokeen aikana lehmiltä kerättiin verinäytteet katetrin, yleensä oikean puolen katetrin eli eri puolelta kuin glukoosi annettiin -15, -5, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150 ja 180 minuutin kuluttua glukoosi-infuusion aloituksesta.

Verinäytettä otettaessa ensimmäinen 10 ml verta heitettiin pois ja seuraava 10 ml kerättiin EDTA-muoviputkiin. Näytteenoton jälkeen katetriin infusoitiin 1,5 ml hepariiniliuosta, jotta veri ei hyytyisi katetrin letkuihin. Verinäytteet sentrifugoitiin heti näytteenoton jälkeen plasman erottamiseksi. Plasma pakastettiin ja säilytettiin -20 °C:ssa insuliinin, glukoosin ja NEFA-pitoisuuden määrittämiseen asti.

Insuliinivastekoe suoritettiin jakson viidentenä päivänä alkaen kello 19.00. Lehmien syönte estettiin vastaavasti kuin glukoosirasituskokeessakin tuntia ennen kokeen alkua ja jatkuen koko kokeen ajan. Insuliinivastekokeessa vasemman puoleisen katetrin kautta infusoitiin insuliinia (Humulin Regular, Lilly Pharma, Giessen, Saksa) suoraan suoneen liuoksena 0,1 IU elopainokiloa kohti. Käytetty insuliinivalmiste vastaa rakenteeltaan ihmisen insuliinin rakennetta. Insuliinivastekokeessa verinäytteitä kerättiin katetrin kautta -15, -5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 90 ja 120 minuutin kuluttua insuliini-infuusion aloituksesta. Insuliinivastekokeen verinäytteet käsiteltiin samalla tavalla kuin glukoosirasituskokeen verinäytteet.

Kaikista insuliinivastekokeen ja glukoosirasituskokeen otetuista verinäytteistä määritettiin glukoosi-, NEFA- ja insuliinipitoisuus. Lehmän numero 480 verinäytteissä havaittiin erityisesti ensimmäisen jakson aikana lipemiaa. Lehmän 480 insuliinivastekokeen ja glukoosirasituskokeen aikaiset NEFA-pitoisuudet erosivat muiden lehmien NEFA-pitoisuuksista niin paljon, että osa tuloksista esitetään ottamatta huomioon lehmän 480 NEFA-pitoisuuksia. Lehmän 480 NEFA-pitoisuuden nosti muita lehmiä korkeammalle todennäköisesti lehmän kokema pelkotila ja sen aiheuttama stressireaktio verinäytteiden otto hetkellä. Stressireaktio nostaa veren katekoliamiinien pitoisuutta ja katekoliamiinit lisäävät lipolyysiä, mikä näkyy kohonneena plasman NEFA-pitoisuutena (Drackley ym. 2005).

Insuliinivastekokeen ja glukoosirasituskokeen verinäytteiden glukoosipitoisuus analysoitiin Konelab T-sarjan glukoosi god-pod menetelmällä (Thermo Scientific) Selected Chemistry Analyser Kone Pro version 5.4 -laitteella Helsingin yliopiston eläinlääketieteellisen tiedekunnan keskuslaboratoriossa. Glukoosin määrittäminen god-pod menetelmällä perustuu glukoosioksideasientsyymiin, jonka katalysoimassa reaktiossa syntyvän värin absorbanssi on suoraan verrannollinen näytteen glukoosipitoisuuksiin.

Verinäytteiden NEFA-pitoisuuden analysointiin käytettiin NEFA-HR(2)-kittiä (Wako Chemicals, GmbH, Neuss, Saksa) ja analyysi suoritettiin Helsingin yliopistollisen eläinlääketieteellisen tiedekunnan keskuslaboratoriossa. Kitin toiminta perustuu asetyylikoentsyymi-A-syntetaasin (ACS) ja asetyylikoentsyymi-A-oksidaasin (ACOD) katalysoimiin reaktioihin, joissa syntyvän värillisen tuotteen absorbanssia mitataan. (Wako Chemicals GmbH 2009).

Verinäytteiden insuliinipitoisuus määritettiin radioimmunologisella mittauksella (RIA) Porcine Insulin Ria-kittiä (Cat #PI-12K, Millipore Corporation, Billerica, USA) käyttäen Helsingin yliopiston maatalous-metsätieteellisen tiedekunnan laitekeskuksen laboratoriossa. RIA-menetelmä perustuu kilpailevaan vasta-aineeseen sitoutumiseen. Reaktioputkessa on aina vakiomäärä kilpailevaa leimattua antigeenia, joka sitoutuu sitä vähemmän spesifiseen vasta-aineeseen, mitä enemmän näytteessä on insuliinia, joka sitoutuu samaan vasta-aineeseen. Näytteen insuliinipitoisuus on kääntäen verrannollinen näytteen radioaktiivisuuden voimakkuuteen. (Välimäki ym. 2000).

### 2.3 Tilastollinen analysointi

Infuusiokokeen tilastollisessa analysoinnissa käytettiin SAS (versio 9.1) Mixed-ohjelmistoa. Tilastollisessa analysoinnissa mallin kiinteinä muuttujina olivat jakso, neliö ja käsittely sekä satunnaismuuttujana koe-eläin. Tilastollisessa analysoinnissa ortogonaaliset kontrastit olivat vesi vastaan rasvakäsittelyt ja camelinaöljykäsittely vastaan talikäsittely.

Insuliinivastekokeen ja glukoosirasituskokeen tulosten analysoimiseksi tarvitaan yksittäisiä arvoja, jotka kuvaavat mahdollisimman hyvin glukoosin, NEFA:n ja insuliinin pitoisuusmuutoksia kokeiden aikana. Kokeiden aikana kerättyjen verinäytteiden analysointitulosten perusteella glukoosille, insuliinille ja NEFA:lle laskettiin seuraavia arvoja: pitoisuus-aikakäyrän alle jäävä pinta-ala (AUC), puoliintumisaika ( $T_{1/2}$ ), perustason saavuttamiseen kuluva aika sekä poistumisnopeus verenkierrosta (CR). Saatuja arvoja testattiin tilastollisesti edellä esitellyillä mallilla. Glukoosirasituskokeessa insuliinin perustaso ei ollut normaalisti jakautunut, joten insuliinin perustason erojen testaamiseksi käytettiin insuliinin perustason logaritmuunnettuja pitoisuuksia.

AUC-arvon laskemiseen käytettiin puolisuunnikasmenetelmään perustuvaa laskutapaa. Verinäytteistä mitatun metaboliitin pitoisuuden muutoksista piirrettiin käyrä ajan funktiona. Käyrän pohjaviivana pidettiin metaboliitin perustasoa. Perustaso laskettiin keskiarvona 15 ja 5 minuuttia ennen glukoosirasitus- ja insuliinivastekokeen alkua otetuista verinäytteistä. AUC-arvon laskemiseksi SAS-ohjelmistoon syötettiin glukoosin, insuliinin tai NEFA:n perustaso sekä kokeen ajalta verinäytteistä mitatut glukoosin, insuliinin ja NEFA:n pitoisuudet. SAS-ohjelmistoon laadittu makro laski metaboliitin AUC-arvon laskien ensin jokaisen mittauspisteen väliin muodostuvan puolisuunnikkaan ja kolmioiden pinta-alan. Lopulliset AUC arvot laskettiin summana kaikkien mittauspisteiden puolisuunnikkaiden ja kolmioiden pinta-aloista. (Shiang ym. 2004). AUC-arvoja laskettaessa rajattiin tarvittaessa laskentaan käytettävää aikaväliä.

Puoliintumisajalla ( $T_{1/2}$ ) tarkoitetaan, kuinka monta minuuttia kestää kokeen alusta saavuttaa puolet glukoosin, insuliinin tai NEFA:n kokeen aikaisesta maksimiarvosta. Poistumisnopeudella tarkoitetaan, kuinka nopeasti keskimäärin glukoosin, insuliinin tai NEFA:n pitoisuus vähenee verenkierrosta yksikkönä- % minuutissa. Puoliintumisajan ja poistumisnopeuden laskemiseen käytettiin SAS-ohjelmiston NLIN-proseduuria. NLIN-proseduuri sovittaa pienimmän neliösumman menetelmällä ja annettujen vakioiden perusteella metaboliitin tai hormonin kokeen aikaisia pitoisuusmuutoksia kuvaavan käyrän eksponentiaaliseen yhtälöön:

$$F(t)=b*e^{-c*t} \text{ (yhtälö 1)}$$

NLIN-proseduuri estimoii vakiot  $b$  ja  $c$  iteroiden sovittamasta epälineaarista funktiosta. Vakioiden  $b$  ja  $c$  alkuarvot arvioitiin glukoosirasituskokeen ja insuliinivastekokeen glukoosin, insuliinin ja NEFA:n pitoisuusmuutoksista piirretyn kuvaajan perusteella. Vakion  $b$  arvo arvioitiin kuvaajasta glukoosin ja insuliinin maksimiarvona ja NEFA:n osalta NEFA:n perusarvona. Vakion  $c$  arvo arvioitiin kuvaajan regressiokertoimena. Poistumisnopeus ja puoliintumisaika voidaan laskea tietylle kokeen aikavälille esimerkiksi kokeen alusta ensimmäiset 120 minuuttia. Aikaväli on ilmoitettava jo NLIN-proseduurin sovittaessa yhtälöä, jotta sovitettu yhtälö kuvastaa mahdollisimman tarkasti glukoosin, insuliinin tai NEFA:n pitoisuuden muutosta tietyllä aikavälillä.

Poistumisnopeuden ja puoliintumisajan laskemiseksi sijoitetaan yhtälöön 1 NLIN-proseduurin estimoimat vakiot ja lasketaan metaboliitin sovitetun kuvaajan mukainen pitoisuus kokeen alussa  $F(t_1)$  ja lopussa  $F(t_2)$ . Poistumisnopeus ja puoliintumisaika tietylle kokeen aikavälille voidaan laskea tämän jälkeen alla olevien yhtälöiden 2 ja 3 mukaisesti:

$$CR= 100 * (\ln[F(t_1)] - \ln[F(t_2)]) / (F(t_2) - F(t_1)) \text{ (yhtälö 2)}$$

$$T_{1/2} = (\ln[2] / CR) * 100 \text{ (yhtälö 3)}$$

Poistumisnopeus on eksponentiaalisen käyrän laskevalle osalle sovitetun suoran kulmakerroin.

### 3. Tulokset

#### 3.1 Lehmien rehun syönti ja rehun laatu

Infuusiokokeen aikana lehmät söivät keskimäärin 8,6 kg kuiva-ainetta päivässä kontrollikäsitelyn jakson aikana. Tali- ja camelinaöljykäsittelyjen aikana lehmät söivät keskimäärin 7,3 kg ka päivässä, mikä on merkitsevästi ( $p < 0,001$ ) vähemmän kuin kontrollikäsitelyn aikana. Erot kuiva-aineen syönnistä johtuvat siitä, että rasvainfuusiot oli laskettu mukaan päivittäiseen energian saantiin, minkä mukaan vähennettiin rasvaa saaneiden päivittäistä seosrehuannosta. Tali- ja camelinakäsittelyjen välillä ei ollut eroa kuiva-aineen syöntimäärissä ( $p = 0,24$ ). Muuntokelpoisen energian saanti oli kontrollikäsitelyn aikana keskimäärin 94,2 MJ ME/päivä, talikäsitelyn aikana keskimäärin 93,6 MJ ME/päivä sekä camelinakäsittelyn aikana 93,3 MJ ME/päivä. Kontrolliryhmän muuntokelpoisen energian saanti oli keskimäärin suurempaa kuin rasvaryhmän, mutta ero oli suuntaa antava ( $p = 0,07$ ).

Koko koejakson ajan lehmät olivat negatiivisessa energiataseessa. Kontrollikäsitelyn aikana energiatase oli keskimäärin -4,5 MJ ME, mikä poikkesi ( $p = 0,02$ ) tali- (-5,0 MJ ME) ja camelinakäsittelyn (-5,5 MJ ME) aikaisesta energiataseesta. Tali- ja camelinaöljyinfusion välillä ei ollut eroa energiataseessa ( $p = 0,17$ ). Koekäsittelyillä ei ollut vaikutusta ravintoaineiden sulavuuteen (taulukko 1). Ainoastaan rasvakäsittelyt paransivat raakarasvan sulavuutta, koska rasvakäsittelyissä suurin osa päivittäisestä rasva-annoksesta annettiin pötsin ohi suoraan juoksutusmahaan.

Taulukko 1. Ravintoaineiden sulavuudet

	Koekäsittely			SEM	P-arvo	
	Kontrolli	Tali	Camelina		K vs R	T vs C
Kuiva-aineen sulavuus %	63,1	63,8	65,2	1,20	0,23	0,29
Raakavalkuusen sulavuus %	61,0	61,7	62,6	1,16	0,36	0,49
Raakarasvan sulavuus %	44,1	69,1	74,4	1,96	<0,01	0,10
NDF-sulavuus %	63,7	62,5	64,0	1,91	0,75	0,39

K = kontrollikäsitely, R = rasvakäsittelyt tali- ja camelinaöljykäsittely, T = talikäsitely, C = camelinaöljykäsittely, SEM = keskivirhe, NDF = neutraalidetergenttikuitu.



Kokeen aikana syötetty heinä-säilörehuseos tehtiin säilörehun oletetun kuiva-ainepitoisuuden perusteella tavoitteena saada seokseen 4/5 säilörehua. Säilöhupaalien todellinen kuiva-ainepitoisuus kuitenkin vaihteli, joten toteutunut heinä-säilörehuseoksen säilörehun osuus kuiva-aineessa oli keskimäärin 82 %. Säilörehun ja heinän keskimääräinen laatu on esitetty taulukossa 2. Säilörehu oli vähän käynyttä, sillä siinä oli matala ammoniumtyppi- ja maitohappopitoisuus sekä riittävästi sokeria jäljellä. Säilörehu oli hyvin sulavaa, sillä säilörehun keskimääräinen D-arvo oli 708 g/kg ka, mikä on märehittäjien tavoitearvon ylärajalla. Säilörehun raakavalkuaispitoisuus oli keskimäärin 135 g/kg ka, mikä on märehittäjien tavoitearvon alarajalla. (Artturi, 2009). Kokeessa käytettyjen heinäpaalien raakavalkuaispitoisuus vaihteli 49- 66 g/ kg ka ja D-arvo oli keskimäärin 606 g/ kg ka.

Negatiivisesta energiataseesta huolimatta koelehmien paino kasvoi kokeen aikana keskimäärin 13,3 kg. Lehmien lähtöpaino vaihteli 584 - 667 kg ja kokeen lopussa lehmät painoivat 604 - 681 kg.

Taulukko 2. Säilörehun ja heinän kemiallinen koostumus

	Säilörehu	Heinä
kuiva-aine (g/ kg ka)	289	756
raakavalkuainen (g/ kg ka)	135	57
raakarasva (g / kg ka)	40	20
NDF (g / kg ka)	552	628
ADF (g/ kg ka)	277	
ME (MJ/ kg ka)	11,3	9,2
D-arvo (g/ kg ka)	708	606
maitohappo (g/ kg ka)	21,4	
sokeri (g/ kg ka)	138	

### 3.2 Glukoosirasituskokeen tulokset

Koejakson neljännen päivän iltana ja viidennen päivän aamuna otetuissa verinäytteissä koekäsittelyt eivät vaikuttaneet merkitsevästi havaittuihin glukoosi- ja insuliinipitoisuuksiin. Neljännen päivän iltana otetuissa verinäytteissä NEFA-pitoisuudessa ei ollut eroa ( $p = 0,21$ ) rasva- ja kontrollikäsittelyn välillä. Rasvakäsitteltyjen NEFA-pitoisuus viidennen päivän aamuna otetuissa verinäytteissä oli korkeampi ( $p = 0,006$ ) kuin kontrollikäsitteltyjen.

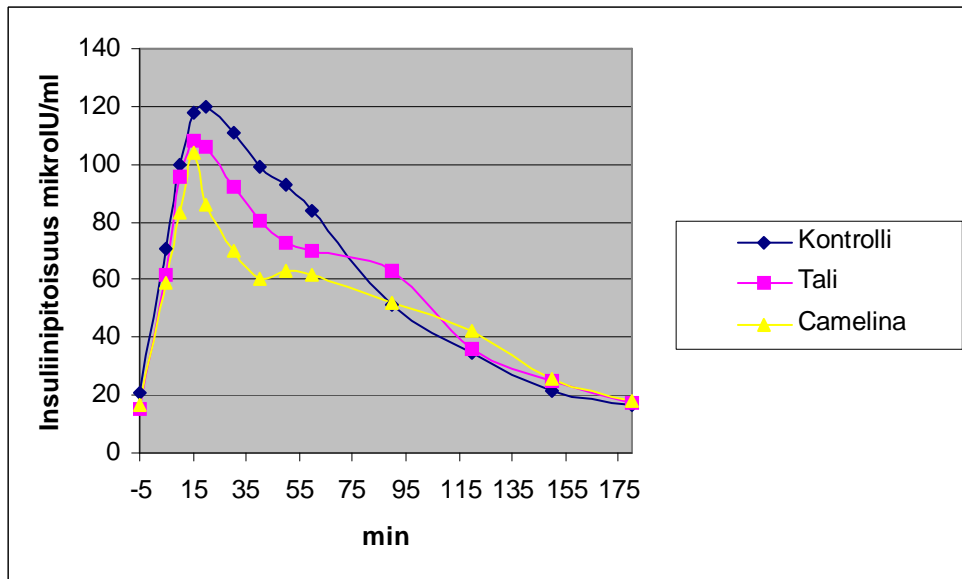
Glukoosirasituskokeen alussa mitatussa glukoosin perustasossa ei myöskään ollut eroa käsittelyryhmien välillä (taulukko 3). Insuliinin perustaso oli kokeen alussa hieman matalampi rasvakäsittelyllä, mutta ero oli suuntaa antava ( $p = 0,07$ , taulukko 3). Aamulla ennen glukoosirasituskoetta otetussa verinäytteessä plasman insuliinipitoisuudet olivat keskimäärin kontrollilla  $16,8 \mu\text{IU/ml}$ , talilla  $14,7 \mu\text{IU/ml}$  sekä camelinalla  $12,7 \mu\text{IU/ml}$  ( $\text{SEM} = 2,0$ ) eikä kontrolli- ja rasvaryhmien välillä ollut eroa ( $p = 0,16$ ).

Glukoosirasituskokeessa rasvaryhmien lehmien plasman glukoosipitoisuus ei noussut yhtä korkeaksi ( $T = 17,6 \text{ mmol/l}$ ,  $C = 17,4 \text{ mmol/l}$ ) kuin kontrolliryhmän lehmien plasman glukoosipitoisuus ( $18,6 \text{ mmol/l}$ ) ( $p = 0,02$ ). Glukoosirasituskokeessa ei ollut eroa rasva- ja kontrollikäsittelyjen välillä insuliinin huippuarvossa (taulukko 3). Rasvakäsittelyt hidastivat glukoosin poistumista verenkierrosta tilastollisesti merkitsevästi ensimmäisten 120 minuutin aikana rasisituskokeen alusta (taulukko 3). Vastaavasti rasvakäsittelyt pidensivät glukoosin puoliintumisaikaa verrattuna kontrollikäsittelyyn, mikä kuvasti rasvakäsittelyjen heikentäneen insuliiniherkkyyttä. Kontrolli- ja rasvaryhmän glukoosin  $\text{AUC}_{120}$ -arvojen välillä ei kuitenkaan ollut merkitsevää eroa glukoosirasituskokeessa (taulukko 3).

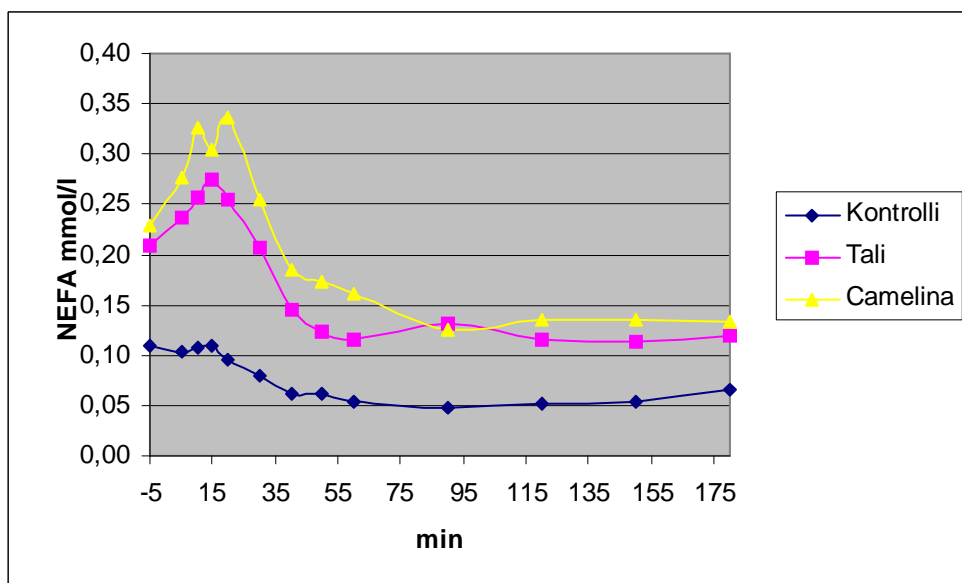
Glukoosirasituskokeessa keskimääräinen insuliinipitoisuus nousi ensimmäisen 15 - 20 minuutin ajan, jonka jälkeen se alkoi laskea (kuvio 1). Insuliinin puoliintumisajassa ja poistumisnopeudessa ei ollut eroja käsittelyjen välillä glukoosirasituskokeen aikana (taulukko 3). Glukoosirasituskokeessa insuliinin  $\text{AUC}_{180}$ :ssa ei myöskään ollut eroja merkitseviä eroja ryhmien välillä (taulukko 3).

Glukoosirasituskokeen alussa rasvaryhmien NEFA:n pitoisuus verenkierrossa nousi hieman, kunnes kohonnut insuliinipitoisuus vaikutti plasman NEFA-pitoisuutta alentavasti (kuvio 2). Rasvakäsiteltyjen lehmien veren NEFA:n perustaso (T = 0,21 mmol/l, C = 0,23 mmol/l) oli korkeampi (p = 0,005) glukoosirasituskokeessa kuin kontrollikäsiteltyjen (K = 0,11 mmol/l) (taulukko 3). Rasvaryhmien veren NEFA:n perustasoa nostava vaikutus oli myös varmistus siitä, että juoksutusmahaan infusoitu rasva oli imeytynyt verenkiertoon.

Glukoosirasituskokeen aikana rasvaryhmien plasman NEFA:n minimipitoisuus (T = 0,10 mmol/l, C = 0,11 mmol/l) oli myös korkeampi kuin kontrolliryhmän (K = 0,004 mmol/l) (p = 0,0007). Glukoosirasituskokeessa NEFA:n minimipitoisuuden saavuttamiseen kuluneessa ajassa ei ollut eroa (p = 0,44) rasva- ja kontrolliryhmien välillä (K = 120 min, T = 110 min, C = 113 min, SEM = 11,9). Myöskään NEFA:n poistumisnopeus, puoliintumisaika ja AUC-arvot eivät eronneet rasva- ja kontrollikäsiteltyjen välillä (taulukko 3). Glukoosirasituskokeessa rasvaryhmien- ja kontrollin välillä ei ollut eroa NEFA:n AUC-arvossa, vaikka NEFA-pitoisuudeltaan muista poikkeava lehmä numero 480 jätettiin tuloksissa huomioimatta. Glukoosirasituskokeen tulosten perusteella camelinaöljyn vaikutus ei eronnut talin vaikutuksesta veren glukoosipitoisuuden säätelyyn yhdenkään kokeessa mitatun parametrin perusteella.



Kuvio 1. Plasman insuliinipitoisuuden muutokset glukoosirasituskokeessa.



Kuvio 2. Plasman NEFA-pitoisuuden muutokset glukoosirasituskokeessa

Taulukko 3. Glukoosirasituskokeen tulokset.

	Käsittelyt			SEM	P-arvo	
	Kontrolli	Tali	Camelina		K vs R	T vs C
<b>Glukoosi</b>						
Perustaso (mmol/l)	3,9	4,1	4,1	0,11	0,12	0,60
Huippuarvo (mmol/l)	18,6	17,6	17,4	0,44	0,02	0,76
CR <sub>120</sub> (%/min)	1,4	1,2	1,0	0,12	0,02	0,40
T <sub>1/2</sub> (120) min	52,3	61,1	69,3	5,08	0,01	0,11
AUC <sub>120</sub> (mmol/l X 120 min)	562	557	598	31	0,69	0,39
<b>Insuliini</b>						
Perustaso (μIU / ml)†	20,7	15,0	16,6	1,79	0,07	0,56
Log perustaso	1,3	1,2	1,2	0,04	0,07	0,62
Huippuarvo (μIU / ml)	128,3	112,8	104,3	14,06	0,17	0,58
CR <sub>180</sub> (%/min)	0,8	0,8	0,7	0,09	0,32	0,41
T <sub>1/2</sub> (180) min	99,4	98,8	123,3	19,96	0,63	0,39
AUC <sub>180</sub> (μIU/l X 180 min)	6704	7170	5886	768	0,81	0,15
<b>NEFA</b>						
Perustaso (mmol/l)	0,11	0,23	0,21	0,03	<0,01	0,53
CR <sub>30</sub> (%/min)	1,4	1,5	1,4	0,19	0,86	0,60
T <sub>1/2</sub> (30)	51,2	47,1	71,4	14,92	0,64	0,24
AUC <sub>60</sub> (mmol/l X 60 min)	-1,7	-1,0	0,8	1,59	0,43	0,45
AUC <sub>60</sub> (mmol/l X 60 min)*	-1,7	0,1	-1,3	1,21	0,48	0,46

K = kontrollikäsittely, R = rasvakäsittelyt tali- ja camelinakäsittely, T = talikäsittely,

C = camelinakäsittely, SEM = keskiarvo. T<sub>1/2</sub> = metaboliitin puoliintumisaika suluissa glukoosirasituskokeen alusta kulunut aika. CR<sub>30</sub>, CR<sub>60</sub>, CR<sub>120</sub> = poistumisnopeus mitattuna glukoosirasituskokeen ensimmäisen 30, 60 ja 120 minuutin aikana. AUC<sub>60</sub> ja AUC<sub>120</sub> = käyrän alle jäävän alueen pinta-ala. † = Insuliinin arvot eivät normaalisti jakautuneita.

\* = Lehmää numero 480 ei huomioitu.

### 3.3 Insuliinivastekokeen tulokset

Rasva- ja kontrollikäsitteilyjen välillä ei ollut eroa insuliinivastekokeen alussa mitatussa glukoosin perustasossa, mutta rasvakäsittelyt vaikuttivat hieman insuliinin perustasoa laskevasti ( $p = 0,09$ ) kontrolliin verrattuna (taulukko 4). Kontrolliryhmän lehmien glukoosin poistumisnopeus oli insuliinivastekokeessa (mitattuna 60 minuuttia kokeen alusta) suurempi ( $p = 0,01$ ) kuin tali- ja camelinaryhmän lehmien (taulukko 4). Tali- ja camelinakäsittelyt myös pidentivät glukoosin puoliintumisaikaa (mitattuna 60 minuuttia insuliinivastekokeen alusta) verrattuna kontrollikäsitteilyyn ( $p = 0,03$ ) (taulukko 4).

Insuliinivastekokeen glukoosin  $AUC_{120}$ -arvon perusteella rasvakäsittelyt heikensivät insuliinivastetta verrattuna kontrolliin, sillä kontrolliryhmän glukoosin  $AUC_{120}$ -arvo oli pienempi ( $p = 0,02$ ) kuin rasvaryhmien. Insuliinivastekokeessa glukoosipitoisuus laski kontrolliryhmällä matalammaksi ( $p = 0,04$ ) kuin rasvaryhmillä (taulukko 4). Kontrolliryhmän glukoosin minimipitoisuuden saavuttamiseen kului myös suuntaa antavasti pidempi aika kuin tali- ja camelinaryhmän. Talikäsitteilyllä kesti vastaavasti suuntaa antavasti ( $p = 0,10$ ) lyhyempi aika minimipitoisuuden saavuttamiseen kuin camelinakäsittelyllä (taulukko 4). Camelinakäsittelyn glukoosin poistumisnopeus, puoliintumisaika sekä AUC-arvot eivät eronneet merkitsevästi talikäsitteilyn vastaavista arvoista insuliinivastekokeessa (taulukko 4).

Insuliinivastekokeessa insuliinin huippuarvossa, poistumisnopeudessa, puoliintumisajassa eikä AUC-arvoissa (kokeen ensimmäisten 30 minuutin ajalta) ollut eroa kontrolli- ja rasvaryhmien välillä (taulukko 4). Camelinaryhmän insuliinin huippuarvo oli tosin suuntaa antavasti ( $p = 0,07$ ) matalampi kuin taliryhmän. Camelinaöljy laski suuntaa antavasti insuliinin poistumisnopeutta ( $p = 0,052$ ) ja pidensi insuliinin puoliintumisaikaa ( $p = 0,01$ ) (mitattuna kokeen ensimmäiseltä 30 minuutilta) verrattuna taliin. Camelinakäsitteltyjen insuliinin  $AUC_{30}$  -arvo oli myös suuntaa antavasti pienempi kuin talikäsitteilyjen (taulukko 4).

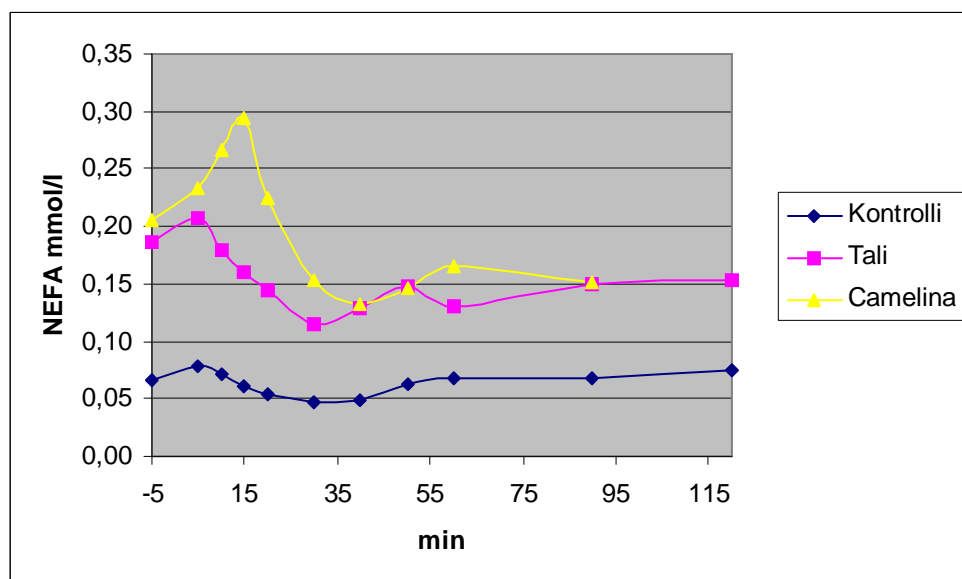
Taulukko 4. Insuliinivastekokeen tulokset.

	Käsittelyt			SEM	P-arvo	
	Kontrolli	Tali	Camelina		K vs R	T vs C
<b>Glukoosi</b>						
perustaso (mmol / l)	3,9	3,8	3,8	0,15	0,23	0,87
CR <sub>60</sub> (%/min)	1,0	0,7	0,8	0,07	0,01	0,12
T <sub>1/2</sub> (60) min	69,9	108,4	88,9	9,18	0,03	0,14
AUC <sub>120</sub> (mmol/l X 120 min)	-159	-127	-137	11	0,02	0,37
T <sub>min</sub>	52,5	38,3	48,3	3,93	0,09	0,10
minimipitoisuus (mmol/l)	2,1	2,3	2,2	0,10	0,04	0,39
<b>Insuliini</b>						
perustaso (μIU / ml)	27,4	23,3	18,7	3,17	0,09	0,24
huippuarvo (μIU / ml)	1517	1643	1168	169	0,57	0,07
CR <sub>30</sub> (%/min)	9,1	9,9	7,0	0,93	0,52	0,05
T <sub>1/2</sub> (30) min	8,2	7,2	10,1	0,71	0,54	0,01
AUC <sub>30</sub> (μIU X 30 min)	14355	14825	13246	736	0,65	0,09
<b>NEFA</b>						
perustaso (mmol/l)	0,07	0,19	0,21	0,02	<0,01	0,25
CR <sub>30</sub> ( %/ min)	2,0	2,3	1,7	0,22	0,77	0,09
T <sub>1/2</sub> (30) min	35,7	41,6	48,0	7,18	0,34	0,55
AUC <sub>60</sub> (mmol X 60 min)	-0,4	-2,4	-1,0	0,80	0,22	0,27
AUC <sub>60</sub> (mmol/l X 60 min)*	-0,5	-2,1	-2,3	0,46	0,04	0,83
T <sub>min</sub>	43,3	41,7	71,7	11,25	0,37	0,11
minimipitoisuus (mol/l)	0,04	0,11	0,12	0,02	<0,01	0,46

K = kontrollikäsittely, R = rasvakäsittely: tali- ja camelinakäsittely, T = talikäsittely, C = camelinakäsittely, SEM = keskivirhe. \* = lehmä numero 480 tuloksia ei huomioitu, T<sub>1/2</sub> = metaboliitin puoliintumisaika suluissa glukoosirasituskokeen alusta kulunut aika, CR<sub>30</sub> ja CR<sub>60</sub> = poistumisnopeus mitattuna insuliinivastekokeen ensimmäisen 30 ja 60 minuutin aikana. AUC<sub>30</sub>, AUC<sub>60</sub> ja AUC<sub>120</sub> = käyrän alle jäävän alueen pinta-ala.

Insuliinivastekokeessa, kuten glukosirasituskokeessakin, rasvaryhmien plasman NEFA:n perustaso oli korkeampi ( $p < 0,0001$ ) kuin kontrolliryhmän. Vastaavasti insuliinivastekokeessa saavutettu kontrolliryhmän NEFA:n minimipitoisuus oli pienempi ( $p = 0,0002$ ) kuin rasvaryhmien minimipitoisuus. Kokeen ensimmäisten 30 minuutin ajalla NEFA:n poistumisnopeudessa ja puoliintumisajassa ei ollut eroa rasvaryhmien ja kontrolliryhmän välillä. Camelinaöljykäsittely laski NEFA:n poistumisnopeutta ( $CR_{30}$ ) suuntaa antavasti ( $p = 0,09$ ) talikäsittelyyn verrattuna, mutta camelinaöljykäsittely ei pidentänyt ( $p = 0,55$ ) NEFA:n puoliintumisaikaa (mitattuna kokeen ensimmäiseltä 30 minuutilta) talikäsittelyyn verrattuna.

Kaikkien lehmien tulokset huomioituna ei  $AUC_{60}$ -arvossa ollut eroa kontrolli- ja rasvakäsittelyjen välillä ( $p = 0,22$ ). Kun tilastollisesta analyysistä jätettiin pois lehmän 480 NEFA:n  $AUC$ -arvot, jotka olivat selkeästi muiden lehmien arvoja suuremmat, huomattiin, että kontrollikäsiteltyjen NEFA:n  $AUC_{60}$  on itseisarvoltaan pienempi ( $p = 0,004$ ) kuin rasvakäsitellyjen NEFA:n  $AUC_{60}$ -arvot. Rasvakäsitellyjen NEFA-pitoisuus kohoaa insuliinivastekokeessa korkeammalle kuin kontrollikäsiteltyjen ja insuliinipitoisuuden kohoaminen laskee rasvakäsitellyjen NEFA-pitoisuuden matalammalle tasolle kuin ennen kokeen alkua (kuvio 3). Lehmä 480 pelkäsi verinäytteiden ottoa, mikä nosti lehmän veren katekoliamiinipitoisuuden, ja täten NEFA-pitoisuuden normaalia korkeammaksi. Erityisesti tämä näkyy lehmän 480 camelinakäsittelyn eli ensimmäisen jakson NEFA- tuloksissa.



Kuvio 3. Plasman NEFA-pitoisuuden muutokset insuliinivastekokeen aikana.



## **4. Tulosten tarkastelu**

### **4.1 Syönnin vaikutus kokeen tuloksiin**

Infuusiokokeen aikana lehmien ruokinta oli rajoitettua ja lehmät söivät yleisesti kaiken saamansa rehun. Lehmien muuntokelpoisen energian keskimääräinen päivä saanti 93,5 MJ ME, mikä oli suurempi kuin Holteniuksen ym. (2003) kokeessa käytetty ummessaolevien lehmien rajoitetun ruokinnan taso 71 MJ ME/päivä. Holteniuksen ym. (2003) kokeessa ummessaoloajan negatiivinen energiatase ei nostanut NEFA-pitoisuutta kuin vasta viikkoa ennen poikimista. Rajoitettu ummessaoloajan ruokinta estää lehmien rasvakudoksen kasvua ummessaoloaikana, eikä vielä käynnistä merkittävästi kehon rasvojen mobilisaatiota. Infuusiokokeessa lehmien paino kasvoi lähinnä sikiön kasvun myötä, sillä energian tarpeeseen oli huomioitu ylläpitotarpeen lisäksi lopputiineyden lisäenergian tarve.

Infuusiokokeessa oli tarkoituksena järjestää yhtä energiapitoiset ruokinnat käsittelyille, jotta erot energian saannissa eivät vaikuttaisi kokeen tuloksiin. Muuntokelpoisen energian saanti oli kuitenkin hieman suurempaa kontrollikäsittelyllä ja rasvakäsiteltyjen energiatase jäi negatiivisemmaksi kuin kontrollin. Kontrolliryhmän muuntokelpoisen energian suurempi saanti aiheutui säilörehun ja heinän odotettua paremmasta sulavuudesta sekä suuremmasta muuntokelpoisen energian määrästä. Ryhmien väliset pienet erot negatiivisessa energiataseessa tuskin vaikuttivat ryhmien NEFA-pitoisuuden eroihin tai käsittelyjen vaikutuksiin.

## 4.2 Insuliinin, glukoosin ja NEFA:n perustasot

Glukoosin perustaso oli ennen glukoosirasitus- ja insuliinivastekoetta keskimäärin 3,9 - 4,1 mmol/l. Infuusiokokeen aikainen lehmien glukoosin perustaso oli selkeästi korkeampi kuin esimerkiksi keskimääräinen glukoosipitoisuus 1 - 4 viikkoa ennen poikimista Holteniuksen ym. (2003) kokeessa (2,8 - 3,1 mmol/l) ja hieman korkeampi kuin Winkelmanin ym. (2008) kokeessa ummessa olevilla lehmillä mitattu keskimääräinen glukoosipitoisuus (3,6 mmol/l). Infuusiokokeessa havaittu lehmien glukoosipitoisuus oli samaa tasoa kuin Kokkosen ym. (2005) tutkimuksessa havaittu ummessaolevien lehmien plasman glukoosipitoisuus. Kokeen rasvakäsittelyillä ei ollut vaikutusta glukoosin perustasaan. Andersenin ym. (2008) kokeessa rasvalisillä ei myöskään ollut vaikutusta ummessaolevien lehmien plasman glukoosipitoisuuteen. Piresin ym. (2008) tutkimuksessa juoksumahaan infusoitu pellavaöljy nosti glukoosin perustasoa verrattuna tali-infuusion, mutta kokeessa käytetyt lehmät eivät olleet tiineitä.

Insuliinin perustaso ennen glukoosirasitus- ja insuliinivastekoetta oli keskimäärin 15,0 - 27,4  $\mu$ IU/ml. Lehmien väliset erot insuliinipitoisuudessa olivat suuria. Rasvakäsittelyt madalsivat insuliinin perustasoa suuntaa antavasti verrattuna kontrollikäsittelyyn. Ummessaoloajan rasvalisä laski insuliinin perustasoa myös Grumin ym. (1996) ja Andersenin ym. (2008) kokeissa. Insuliinin kuten glukoosinkin perustaso erosi aiemmissa kokeissa havaituista ummessaolevien lehmien insuliinipitoisuuksista. Esimerkiksi Holteniuksen ym. (2003) kokeessa lehmien insuliinipitoisuus vaihteli 7 - 18  $\mu$ IU/ml 1 - 5 viikkoa ennen poikimista ja Kokkosen ym. (2005) kokeessa 1 - 3 viikkoa ennen poikimista lehmien insuliinipitoisuus vaihteli 8 - 12  $\mu$ IU/ml. Piresin ym. (2008) ei-tiineillä ummessaolevilla lehmillä havaittiin tali- ja pellavaöljyinfuusion jälkeen yhtä korkeita insuliinipitoisuuksia kuin tässä tutkimuksessa. Kokeiden välisiä eroja saattaa selittää insuliinin määrittämisessä käytetyt kitit ja niiden väliset erot mittaustasossa.

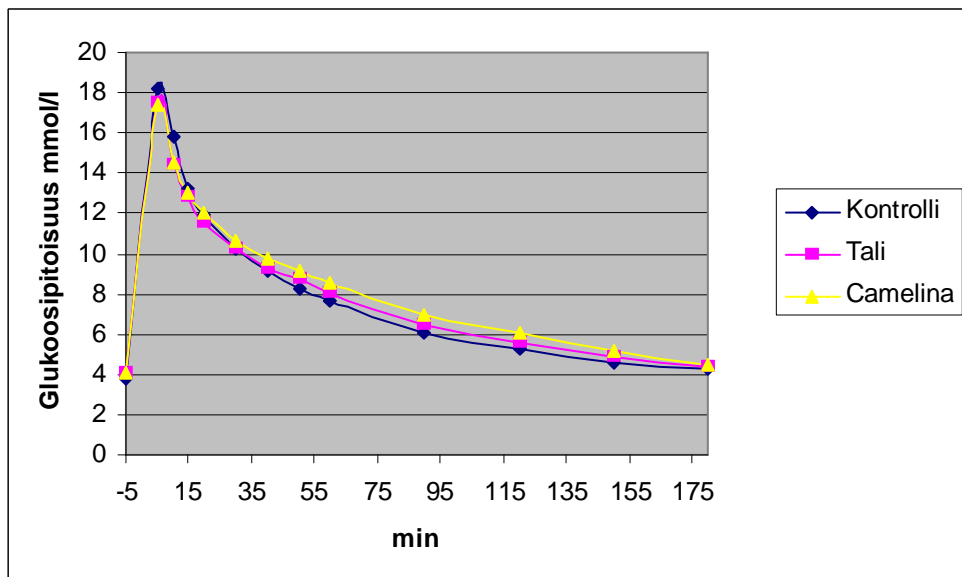
Rasvainfuusioiden tarkoitus oli nostaa koejakson ajan veren NEFA-tasoa mallintaen viimeisen tiineysviikon aikaista sekä poikimisen jälkeistä rasvojen mobilisaatioita. Rasvaryhmien rasvojen imeytyminen verenkiertoon oli lisääntynyt, mikä näkyi koko kokeen ajan rasvaryhmien merkittävästi ( $p < 0,05$ ) korkeampana NEFA-pitoisuutena kontrolliryhmään verrattuna. Kokeessa havaittu kontrolliryhmän NEFA-pitoisuus (0,07 / 0,11 mmol/l) oli samaa tasoa kuin Andersenin ym. (2008) ja Winkelmanin ym. (2008) ummessaolevilla lehmillä havaittu NEFA-pitoisuus 1 - 5 viikkoa ennen poikimista sekä Piresin ym. (2007) ei-tiineillä ummessaolevilla lehmillä havaittu NEFA-pitoisuus. Kontrolliryhmän NEFA:n perustaso oli kuitenkin matalampi kuin Holteniuksen ym. (2003) kokeissa havaittu rajoitustasi ruokittujen ummessaolevien lehmien NEFA-pitoisuus. Kontrolliryhmän NEFA-pitoisuus vastasikin paremmin ummessaoloaikana lievästi yliruokittujen (110 % laskennallisesta energian tarpeesta) ja 8 - 5 viikkoa ennen poikimista havaittuihin NEFA-tasoihin (Holtenius ym. 2003).

Tali- ja camelinakäsittely nosti NEFA-pitoisuuden (0,19 - 0,23 mmol/l) korkeammaksi kuin Piresin ym. (2008) kokeessa ilman ruokinnan rajoitusta havaittu pellavaöljy- ja talikäsiteltyjen NEFA-pitoisuus (0,106 - 0,113 mmol/l). Vastaavasti ummessaoloajan rasvalisärehun mukana syötettynä kohotti viidestä yhteen viikkoa ennen poikimista havaittua NEFA-pitoisuutta (0,148 - 0,164 mmol/l) vähemmän kuin tämän kokeen rasvainfuusiot (Andersen ym. 2008). Kokeessa havaitut NEFA:n perustasot olivat samaa tasoa kuin Kokkosen ym. (2005) ja Keselin ym. (2008) kuin 1 - 2 viikkoa ennen poikimista havaitut keskimääräiset NEFA-pitoisuudet.

Rasvainfuusiot onnistuivat nostamaan NEFA-pitoisuutta noin viikkoa ennen poikimista havaitulle NEFA-tasolle. Sen sijaan Piresin ym. (2007) kokeessa suoraan suoneen infusiotu tali nosti NEFA-pitoisuuden (0,295 mmol/l) korkeammalle kuin tässä kokeessa havaittu rasvainfuusioitujen NEFA:n pitoisuus. Piresin ym. (2007) kokeessa käytetty tali-infusion päivittäinen määrä oli suurempi (1,1 g talia / elopainokilo) kuin tässä kokeessa. Tämän kokeen rasvan saanti oli rasvainfuusioryhmissä noin 430 g päivässä, mikä vastaa noin 0,6 - 0,7 g elopainokiloa kohti riippuen eläimen painosta. Piresin ym. (2008) kokeessa rasvan saanti oli vain 0,5 g rasvaa/ elopainokilo, mikä on hieman vähemmän kuin tämän kokeen päivittäinen rasva-annos. Chilliardin ja Ottoun (1995) kokeessa lypsykauden keskivaiheessa olevien lehmien merkittävä NEFA:n perustason nousu saatiin aikaan 1100 g päivittäisellä rypsiöljyannoksella ohutsuoleen.

### 4.3 Rasvainfuusioiden vaikutus insuliiniresistenssiin glukoosirasituskokeessa

Glukoosirasituskokeessa plasman glukoosipitoisuus nousee, kunnes insuliinipitoisuuden kohoaminen tehostaa glukoosin soluihin ottoa ja plasman glukoosipitoisuus laskee (kuvio 4). Kontrolliryhmän glukoosipitoisuus nousi glukoosirasituskokeessa rasvaryhmiä merkitsevästi korkeammalle, mikä on ristiriidassa Piresin ym. (2008) kokeen tuloksiin, jossa rasvalisällä ei ollut vaikutusta glukoosin huippuarvoon glukoosirasituskokeessa. Glukoosirasituskokeessa korkeampi glukoosin huippuarvo viittaa Hayirlin ym. (2001) mukaan heikentyneeseen insuliinivasteeseen. Kontrolliryhmän insuliinin perustaso on myös glukoosirasituskokeen alussa suuntaa antavasti korkeampi ja pitkäaikaisesti kohonnut insuliinipitoisuus aiheuttaa insuliinireseptorien muuttumista insuliinille resistenteiksi (Kahn 1978). Kontrolliryhmän glukoosipitoisuuden korkeampaa huippuarvoa ja kohonnutta insuliinipitoisuutta ei selitä glukoosin perustaso, joka on kontrolliryhmällä matalampi kuin rasvaryhmillä. Rasvaryhmän matalampi glukoosin huippuarvo voi sen sijaan johtua suuremmasta glukoosin käytöstä kohdesoluissa, kuten rasvasolujen lisääntyneestä glukoosin käytöstä triglyseridien synteesiin.



Kuvio 4. Glukoosipitoisuuden muutokset glukoosirasituskokeessa.

Kontrolliryhmän merkitsevästi nopeampi glukoosin poistumisnopeus ja lyhyempi puoliintumisaika osoittavat kuitenkin, että rasvaryhmien insuliiniherkkyys on heikompi kuin kontrolliryhmän. Tehostunut glukoosin käyttö ei ole seurausta suuremmasta insuliinipitoisuudesta vaan kontrolliryhmän paremmasta insuliiniherkyydestä glukoosirasituskokeen aikana, sillä insuliinin huippuarvoissa eikä AUC-arvoissa ollut eroa ryhmien välillä. Suoneen infusoitu tali hidasti vastaavasti glukoosin poistumisnopeutta ja pidensi glukoosin puoliintumisaikaa Piresin ym. (2007) kokeessa. Piresin ym. (2007) kokeessa glukoosirasituskokeen insuliinin AUC-arvo oli tosin myös pienempi ja insuliinin huippuarvo matalampi kontrolliryhmällä verrattuna taliryhmään. Chilliardin ja Ottoun (1995) kokeessa ohutsuoleen infusoitu rypsiöljy pidensi myös glukoosin puoliintumisaikaa ja hidasti glukoosin poistumisnopeutta glukoosirasituskokeessa.

Piresin ym. (2008) kokeessa rasvakäsittelyt (juokutusmahaan infusoitu pellavaöljy ja tali) eivät vaikuttaneet glukoosirasituskokeessa havaittuun glukoosin poistumisnopeuteen, mutta glukoosirasituskokeessa tali- ja pellavakäsitteltyjen insuliinin AUC-arvo oli suurempi kuin kontrollikäsiteltyjen, jolloin samaan glukoosin poistumisnopeuteen vaadittiin suurempi insuliinipitoisuus rasvaryhmillä. Vastaavasti Gaynorin ym. (1996) tutkimuksessa juokutusmahaan infusoidut *cis*-C18:1 ja *trans*-C18:1-rasvahapot eivät vaikuttaneet glukoosin poistumisnopeuteen glukoosirasituskokeessa. Insuliinin AUC-arvo oli kuitenkin glukoosirasituskokeessa merkitsevästi pienempi kontrolliryhmällä kuin *cis*-C18:1 ja *trans*-C18:1-rasvahapoilla infusoiduilla lehmillä. Insuliinin pienempi AUC-arvo on yleensä seurausta vähentyneestä insuliinin erityksestä glukoosipitoisuuden kohotessa kuin lisääntyneestä insuliinin poistumisnopeudesta glukoosirasituskokeessa (Bossaert ym. 2008). Rasvakäsitteltyjen korkeampi insuliinin AUC-arvo glukoosirasituskokeessa osoittaaakin rasvainfuusioiden heikentäneen insuliiniherkkyttä myös Gaynorin ym.(1996) ja Piresin ym.(2008) kokeessa.

Glukoosirasituskokeessa havaittu glukoosin poistumisnopeus (% / min) oli lukuarvoltaan pienempi ja glukoosin puoliintumisaika pidempi tässä kokeessa kuin aiemmissa insuliiniresistenssiä tutkivissa kokeissa on havaittu (Holtenius ym. 2003, Chagas ym. 2009). Erot glukoosin poistumisnopeuden ja puoliintumisajan arvoissa johtuvat todennäköisesti glukoosirasituskokeen menetelmän eroavuuksista mm. glukoosiannoksen ja mittausajan suhteen sekä erityisesti lehmien tuotosvaiheen eroista.

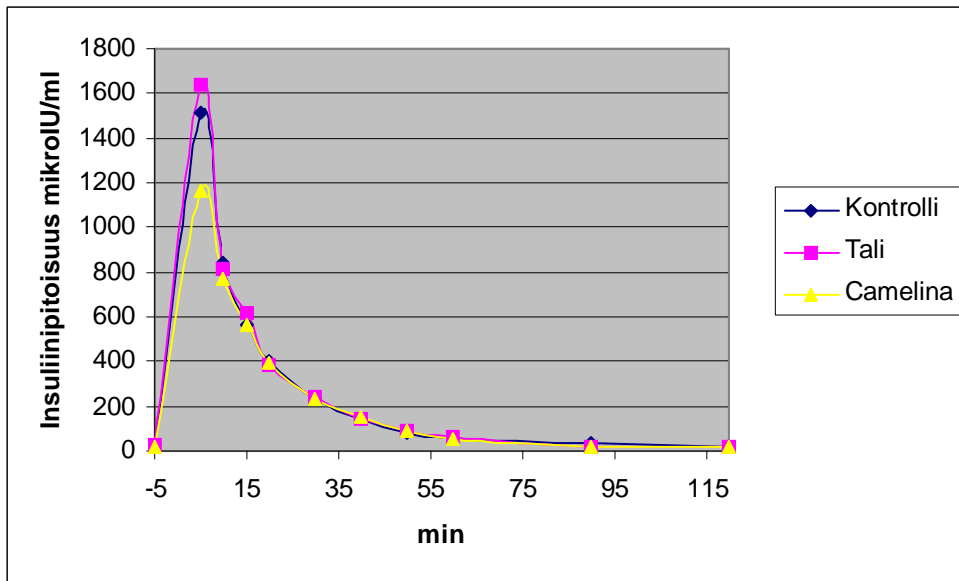
Glukoosirasituskokeessa glukoosin AUC-arvoissa ei havaittu eroja kontrolli- ja rasvakäsittelyjen välillä tässä tutkimuksessa. Piresin ym. (2007) kokeessa talikäsitteltyjen glukoosirasituskokeen glukoosin AUC-arvot olivat merkitsevästi suurempia kuin kontrollikäsiteltyjen. Piresin ym. (2007) glukoosirasituskokeen tulosten perusteella voidaan selkeästi osoittaa talikäsittelyn aiheuttavan insuliiniresistenssin, mutta myös tämän kokeen ja useiden aiempien kokeiden perusteella (Palmquist ja Moser 1981, Chilliard ja Ottou 1995, Gaynor ym. 1996) sekä tyydyttyneitä että mono- ja monityydyttymättömiä rasvahappoja sisältävät rasvalisät näyttävät heikentävän glukoosirasituskokeessa havaittua insuliiniherkkyyttä verrattuna kontrollikäsitteilyihin ainakin tuotoskauden keskivaiheen ja ummessaolokauden aikana.

Camelinäkäsittely ei eroa minkään glukoosirasituskokeessa mitatun parametrin osalta talikäsittelyn vaikutuksesta. Tämä on ristiriidassa Piresin ym. (2008) tutkimuksen kanssa, jossa pellavaöljyinfuusio pienensi glukoosirasituskokeessa havaittua insuliinin huippuarvoa ja AUC-arvoa tali-infuusioon verrattuna. Rottien haimasoluilla tehtyjen kokeen perusteella tyydyttyneet rasvahapot lisäävät glukoosin stimuloimaa insuliinin eritystä merkitsevästi enemmän kuin tyydyttymättömät rasvahapot (Stein ym. 1997). Pellavaöljyinfusioiden osoittivatkin tali-infusioihin verrattuna parantavan glukoosirasituskokeessa havaittua insuliiniherkkyyttä, mutta camelinaöljy ei vaikuttanut tässä kokeessa vastaavasti.

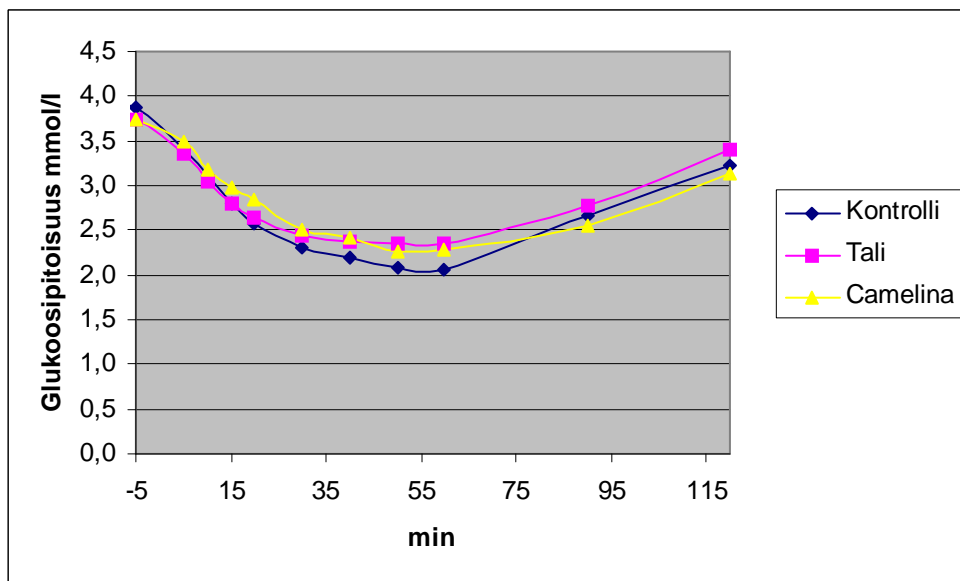
#### 4.4 Rasvainfuusioiden vaikutus insuliiniresistenssiin insuliinivastekokeessa

Insuliinivastekokeessa annettava insuliiniannos nostaa insuliinipitoisuuden paljon korkeammalle tasolle kuin insuliinipitoisuus on missään normaalissa fysiologisessa tilanteessa. Eksogeenisen insuliinin avulla nostettu insuliinipitoisuus alkaa pian laskea insuliinin reagoiessa kohdesolujen reseptoreiden kanssa tai poistuessa verenkierrosta maksan endosytoosilla (Najjad 2001) (kuvio 5). Insuliinivastekokeessa insuliinin poistuminen ja insuliinin glukoosipitoisuutta laskeva vaikutus saattavat olla normaalista poikkeavaa elimistön reagoiessa erilalla normaalialueen korkeampaan insuliinipitoisuuteen ja nopeasti laskeneeseen glukoosipitoisuuteen (Muniyappa ym. 2008). Korkealla insuliinipitoisuudella voidaan kuitenkin osoittaa insuliinin maksimivaste glukoosipitoisuuden laskemiseen. Insuliinivastekoe ei kuitenkaan ole kovin herkkä näyttämään eroja insuliiniherkkyydessä euglykemiseen hyperinsuliiniseen kokeeseen verrattuna (Muniyappa ym. 2008).

Rasvakäsittelyt pidensivät glukoosin puoliintumisaikaa, hidastivat glukoosin poistumisnopeutta ja suurensivat glukoosin AUC-arvoa insuliinivastekokeessa verrattuna kontrollikäsitteilyyn (kuvio 6). Insuliinivastekokeen glukoosiarvojen perusteella molemmat rasvakäsittelyt heikensivät insuliinivastetta. Rasvaryhmien heikentynyt insuliinivaste näkyi myös suuntaa antavasti korkeampana insuliinivastekokeen aikaisena glukoosin minimitasona. Piresin ym. (2007) kokeessa talikäsitteilyllä oli vastaava vaikutus glukoosin poistumisnopeuteen, puoliintumisaikaan sekä AUC<sub>30</sub>-arvoon kuin tässä kokeessa tali- ja camelina-infuusioilla. Piresin ym. (2008) kokeessa tali-infuusioilla ei sen sijaan ollut vaikutusta glukoosiparametreihin insuliinivastekokeessa. Ohutsuoleen infusoitu rypsiöljy ei myöskään heikentänyt insuliinivastekokeessa havaittua glukoosin poistumista (Chilliard ja Ottou 1995).



Kuvio 5. Insuliinipitoisuuden muutokset insuliinivastekokeessa.



Kuvio 6. Glukoosipitoisuuden muutokset insuliinivastekokeessa.



Insuliinivastekokeen aikana camelinaöljy- ja talikäsittelyt eivät eronneet insuliinin poistumista mittaavien parametrien osalta kontrollikäsittelyn vaikutuksesta. Myöskään Piresin ym. (2007) ja (2008) kokeessa tali ei vaikuttanut insuliinin puoliintumisaikaan, poistumiseen tai AUC-arvoihin insuliinivastekokeessa. Sen sijaan tämän kokeen camelinaöljykäsittely ja Piresin ym. (2008) kokeen pellavaöljykäsittely hidastivat suuntaa antavasti insuliinivastekokeessa havaittua insuliinin poistumisnopeutta verrattuna talikäsittelyyn. Camelinaöljykäsittely hidasti insuliinin poistumista ja täten pidentä insuliinin puoliintumisaikaa merkitsevästi talikäsittelyyn verrattuna. Pellavaöljykäsittely vaikutti vain suuntaa antavasti insuliinin puoliintumisaikaa pidentäen (Pires ym. 2008). Camelinaryhmän insuliinivastekokeessa saavuttama insuliinin huippuarvo jäi myös suuntaa antavasti matalammaksi kuin taliryhmän.

Runsaasti alfa-linoleenihappoa sisältävän rasvalisän on osoitettu myös ihmisillä hidastavan insuliinin poistumisnopeutta verrattuna tyydyttyneitä rasvahappoja sisältävään rasvalisään (Xiao ym. 2006). Suurin osa haiman erittämästä insuliinista kulkeutuu ensimmäisenä maksaan. Maksan poistaa osan sinne tulevasta insuliinista endosytoosilla (Lewis ym. 2002). Naudan maksasoluilla tehtyjen kokeiden perusteella rasvan kertyminen maksaan ja korkea NEFA-pitoisuus heikensivät maksan insuliinin endosytoosia (Strang ym. 1998). Rasvan kertymien maksasoluihin lisää mahdollisesti maksan insuliiniresistenssiä, jolloin insuliinin poistuminen elimistöstä vähenee.

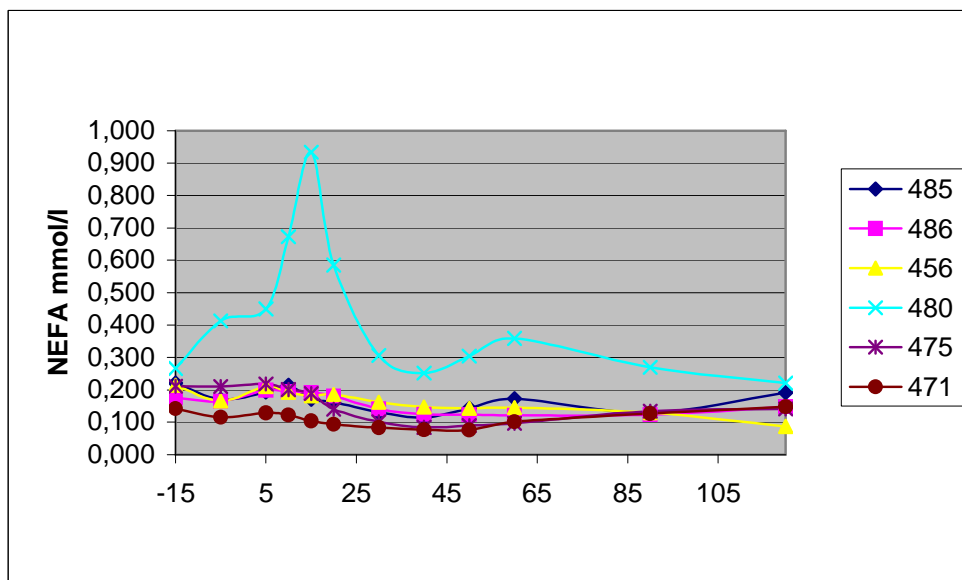
Pellavaöljyllä ja muilla runsaasti monityydyttymättömiä omega-3-rasvahappoja sisältävillä öljyillä on kuitenkin osassa tutkimuksista havaittu maksan triglyseridien kertymistä vähentävä vaikutus (Mashek ja Grummer 2003, Mashek ym. 2005). Toisaalta Brickner ym. (2009) eivät havainneet eroa maksan triglyseridien kertymisessä tali- ja pellavansiemen ruokintojen välillä. Mikäli monityydyttymättömät omega-3-rasvahapot lisäisivät insuliinin poistumisnopeutta, niiden insuliiniresistenssiä heikentävä vaikutus saattaisi olla seurausta maksan parantuneesta insuliiniherkkyydestä. Tutkimuksissa, joissa omega-3-rasvahapot ovat heikentäneet insuliiniresistenssiä, vaikutus ei ole ollut seurausta insuliinin lisääntyneestä poistumistehokkuudesta (Delarue ym. 2006, Pires ym. 2008).

Xiao ym. (2006) epäilivät monitydyttymättömien rasvahappojen heikentävän haiman insuliinin eritystä, mikä vaikuttaisi myös insuliinin poistumisnopeutta hidastavasti. Täten maksasolut vähentäisivät insuliinin endosytoosia, jotta elimistön insuliinipitoisuus ei laskisi liian alas. Insuliinivastekokeessa insuliinipitoisuuden muutokset ovat kuitenkin niin paljon normaalitasoa korkeammat, että haiman insuliinierityksen vähentymisestä seurannut insuliinin poistumisnopeuden hidastuminen ei riitä selittämään camelinäkäsittelyn vaikutusta eksogeenisen insuliinin poistumisnopeuteen. Monitydyttymättömien ja tyydyttyneiden rasvahappojen saannin vaikutusta maksan ja haiman väliseen vuorovaikutukseen ei myöskään ole tutkittu lehmillä.

#### 4.5 Rasvainfuusioiden vaikutus antilipolyttiseen vasteeseen

Glukoosirasitus- ja insuliinivastekokeen alussa veren NEFA-pitoisuus (kuvio 2 ja 3) nousi hieman. Rasvaryhmien, erityisesti camelinaryhmän, NEFA-pitoisuuden nousu oli hieman voimakkaampaa verrattuna kontrollikäsitteeseen erityisesti glukoosirasituskokeen aikana (kuvio 2). Keskimääräisen NEFA-pitoisuuden nousu camelinaryhmässä johtui lähinnä lehmän 480 suuremmasta NEFA-pitoisuuden kohoamisesta glukoosirasitus- ja insuliinivastekokeen aikana (kuvio 7). Lehmän 480 NEFA-pitoisuudet olivat myös korkeammalla tali- ja kontrollikäsitteilyn aikaisen insuliinivaste- ja glukoosirasituskokeen aikana lehmän kokeman jännityksen takia.

NEFA-pitoisuuden lievä kohoaminen insuliinivastekokeen ja glukoosirasituskokeen alussa saattaa johtua lehmien kokemasta lievästä jännityksessä kokeiden alussa. Gagliostro ym. (1991) tutkimuksessa tuotoskauden keskivaiheessa havaittiin katekoliamiinien lisäävän lipolyysiä enemmän rasvalisällä ruokituilla kuin kontrolliruokituilla lehmillä. Lehmät sopeutuvat kohonneeseen NEFA-pitoisuuteen parantamalla sekä  $\beta$ - että  $\alpha$ -adrenergisten reseptoreiden vastetta (Gagliostro ym. 1991).



Kuvio 7. Camelinakäsittelyn vaikutus yksittäisten lehmien NEFA-pitoisuuden muutoksiin insuliinivastekokeessa.

Insuliini vaikuttaa NEFA-pitoisuutta laskevasti eli antilipolyttisesti, kun eläin on negatiivisessa energiataseessa ja käyttää kudosasvoja energian lähteenään. Poikimisen jälkeen insuliinin NEFA-pitoisuutta laskevan vaikutuksen on havaittu heikentyvän, mikä kuvastaa rasvakudoksen insuliiniherkkyyden laskeneen poikimisen jälkeen (Patton ym. 2009). Tässä kokeessa rasvaryhmien NEFA-pitoisuutta kohotti enimmäkseen juoksutusmahaan infusoitu rasvalisä. Osittain NEFA-pitoisuutta nosti mahdollisesti myös rasvakudoksen lisääntynyt lipolyysi. Rasvaryhmien lipolyysiä stimuloi lievästi negatiivinen energiatase sekä insuliinivastekokeen alussa kohonnut katekoliamiinien pitoisuus, mikä kiihdytti lipolyysiä enemmän rasvaruokituilla (Gagliostro ym. 1991). Rasvakäsittely nosti insuliinivastekokeessa havaittua NEFA:n AUC<sub>60</sub>-arvo (lehmän 480 tulokset huomioimatta) itseisarvoltaan merkitsevästi suuremmaksi kuin kontrollikäsittely, mikä kuvasta korkean insuliinipitoisuuden vaikuttaneen antilipolyttisesti rasvaryhmillä.

Piresin ym. (2008) kokeessa pellavaöljyinfuusio nopeutti 3 vuorokauden paaston jälkeen glukosirasituskokeessa havaittua NEFA:n poistumista ja lyhensi NEFA:n puoliintumisaikaa tali- ja vesi-infuusioon verrattuna. Camelinaöljyllä ei kuitenkaan havaittu rasvakudoksen insuliiniherkkyyttä parantavaa vaikutusta. Camelinaöljyn insuliiniherkkyyttä mahdollisesti parantava vaikutus saattoi jäädä huomaamatta, koska tässä tutkimuksessa ei varsinaisesti stimuloitu lipolyysiä. Camelinakäsittelyn suuntaa antavasti hitaampi NEFA:n poistumisnopeus insuliinivastekokeessa talikäsitteilyyn verrattuna saattoi aiheutua lehmän 480 poikkeavista NEFA-arvoista. Muut tämän tutkimuksen tulokset eivät anna viitteitä camelinaöljyn vaikuttaneen insuliiniherkkyyttä heikentävästi talikäsitteilyyn verrattuna.

## 5. Yhteenveto ja johtopäätökset

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, kuinka juoksutusmahaan infusoitu tali ja camelinaöljy vaikuttavat tiineiden ummessaolevien lehmien insuliiniresistenssin. Tutkimusten tulosten perusteella tali- ja camelinaöljykäsittelyt eivät vaikuttaneet lehmien rehun syöntiin, eivätkä energiataseen erot selittäneet tutkimuksessa havaittuja käsittelyjen välisiä eroja. Juoksutusmahaan infusoitu tali ja camelinaöljy nostivat veren NEFA:n perustasoja (0,19 - 0,23 mmol/l) kontrolliin (0,11/0,07 mmol/l) verrattuna. Lehmien veren NEFA-pitoisuus saavutti suunnilleen viikkoa ennen poikimista havaitun NEFA-tason. Rasvakäsittelyillä ei ollut vaikutusta glukoosin perustasaan, mutta rasvakäsittelyt vaikuttivat insuliinin perustasoja madaltavasti. Camelinaöljykäsittely hidasti insuliinivastekokeessa havaittua insuliinin poistumista, mutta muuten insuliinipitoisuuden muutokset insuliinivaste- ja glukoosirasituskokeessa eivät eronneet käsittelyjen välillä. Tali- ja camelinakäsittelyt heikensivät insuliinivaste- ja glukoosirasituskokeessa havaittua ekso- ja endogeenisen insuliinin stimuloimaa glukoosin soluunottoa. Tulosten perusteella talikäsittely aiheutti lehmille insuliiniresistenssin, mutta tutkimushypoteesista poiketen myös camelinakäsittely vaikutti insuliiniresistenssiin samoin.

Nykytiedon perusteella ei voida täysin selvittää syytä, miksi camelinaöljykäsittely hidasti insuliinin poistumisnopeutta insuliinivastekokeessa. Endogeenisen insuliinin poistuminen ei camelinakäsittelyn vaikutuksesta kuitenkaan ollut heikentynyt glukoosirasituskokeen tulosten perusteella. Jatkossa olisi tarpeellista tutkia, kuinka tyydyttyneet ja monitydyttymättömät rasvahapot vaikuttavat lehmän haiman ja maksan insuliinin metaboliaan. Tulevaisuudessa olisi myös mielenkiintoista selvittää, kuinka yksittäisten rasvahappojen juoksutusmahainfuusiot vaikuttavat tiineiden ummessaolevien lehmien insuliiniresistenssin kehittymiseen. Tämänkin kokeen tulosten perusteella talissa esiintyvä palmitiinihappo on todennäköisesti insuliiniresistenssiä voimistava rasvahappo. Suuri linolihappopitoisuus sen sijaan on yhteistä sekä talille että camelinaöljylle. Linolihappo voi palmitiinihapon ohella olla insuliiniresistenssiä voimistava rasvahappo, jolloin esimerkiksi camelinaöljyn alfa-linoleenihiapon mahdollinen insuliiniherkkyyttä lisäävä vaikutus jää tutkimuksessa huomaamatta.

Tulevaisuudessa insuliiniresistenssin mittaamiseen kannattaisi myös kehittää yhtenäisimpiä menetelmiä. Tulosten vertaaminen toisiinsa olisi helpompaa mikäli tutkijat käyttäisivät samoja laboratorio- ja tilastomenetelmiä insuliiniresistenssin arvioimiseen. Insuliiniresistenssin mittaamiseen saattaisi olla hyvä kehittää myös selkeitä rajoja, joilla lehmät voitaisiin luokitella insuliiniherkkyydeltään terveisiin ja sairaisiin. Helppo ja nopea mittari insuliiniresistenssin lehmien väliseen arviointiin saattaisi olla esimerkiksi Holteniuksen ja Holteniuksen (2007) esittelemä kvantitatiivinen insuliiniherkkyys-indeksi (RQUICKI), jonka tarkkuus ja verrannollisuus insuliinivastekokeeseen ja glukoosirasituskokeeseen verrattuna on vielä selvittämättä.

Monityydyttymättömiä rasvahappoja sisältävä camelinaöljy nosti veren NEFA-pitoisuutta yhtäläillä kuin tyydyttyneitä rasvahappoja sisältävä tali. Camelinaöljy myös heikensi tässä tutkimuksessa insuliiniherkkyttä kuten tali. Tutkimuksen lyhytaikaisuudesta johtuen ei voida kuitenkaan päätellä, miten ummessaoloajan camelinakäsittely vaikuttaisi poikimisen jälkeiseen insuliiniresistenssiin. Mikäli yksittäisillä monityydyttymättömillä tai omega-3-rasvahappolisillä voitaisiin osoittaa insuliiniherkkyden lisääntyminen, olisi näitä rasvahappoja sisältävistä ruokinnoista todennäköisesti enemmän hyötyä poikimisen jälkeen.

## Kirjallisuus

Andersen, J. B., Ridder, C. & Larsen, T. 2008. Priming the cow for mobilization in the periparturient period: effects of supplementing the dry cow with saturated fat or linseed. *Journal of Dairy Science* 91: 1029-1043.

Artturi-verkkopalvelu 2009. Saatavilla URL = [https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/Artturi/Rehuanalyysi/Rehuanalysin\\_tulkinta\\_marehtijat/Kemiallinen\\_koostumus#Raakavalkuainen](https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/Artturi/Rehuanalyysi/Rehuanalysin_tulkinta_marehtijat/Kemiallinen_koostumus#Raakavalkuainen).

Viitattu 1.8.2009.

Barrès, R., Osler, M.E., Yan, J., Rune, A., Fritz, T., Caidahl, K., Krook, A. & Zierath, J.R. 2009. Non-CpG methylation of the PGC-1 $\alpha$  promoter through DNMT3B controls mitochondrial density. *Cell Metabolism* 10: 189-198.

Bell, A.W. & Bauman, D.E. 1997. Adaptation of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2: 265-278.

Bigner, D.R., Goff, J.P., Faust, M.A., Burton, J.L., Tyler, H.D. & Horst, R.L. 1996. Acidosis effects on insulin response during glucose tolerance tests in Jersey cows. *Journal of Dairy Science* 79: 2182-2188.

Brickner, A.E., Pires, J.A.A., Gressley, T.F. & Grummer, R.R. 2009. Effects of abomasal lipid infusion on liver triglyceride accumulation and adipose lipolysis during fatty liver induction in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 92: 4954-4961.

Bossaert, P., Leroy, J. L. M. R., Campeneere, S. D., Vlieghe, S. D. & Opsomer, G. 2008. Differences in the glucose-induced insulin response and the peripheral insulin responsiveness between neonatal calves of the Belgian Blue, Holstein-Friesian, and East Flemish breeds. *Journal of Dairy science* 92: 4404-4411.

Chagas, L.M., Lucy, M.C., Back, P.J., Blache, D., Lee, J.M., Gore, P.J.S., Sheahan, A.J. & Roche J.R. 2009. Insulin resistance in divergent strains of Holstein-friesian dairy cows offered fresh pasture and increasing amounts of concentrate in early lactation. *Journal of Dairy Science* 92: 216-222.

- Chilliard, Y. & Ottou, J.F. 1995. Duodenal infusion of oil in midlactations cows. 7. Interaction with niacin on responses to glucose, insulin and  $\beta$ -agonist challenges. *Journal of Dairy Science* 78: 2452-2463.
- Clarke, S. D. 2000. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. *British Journal of Nutrition* 83 suppl.2 : S59-S66.
- Cummins, K. A. & Sartin, J. L. 1987. Response of insulin, glucagon, and growth hormone to intravenous glucose challenge in cows fed high fat diets. *Journal of Dairy Science* 70: 277-283.
- Dann, H.M., Morin, D.E., Bollero, G.A., Murphy, M.R. & Drackley, J.K. 2005. Prepartum intake, postpartum induction of ketosis, and periparturient disorders affect the metabolic status of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88: 3249-3264.
- Drackley, J., Dann, H., Douglas, G., Guretzky, N.A., Litherland, N., Underwood, J.P. & Loor, J.J. 2005. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Italian Journal of Animal Science* 4: 323-344.
- Delarue, J., Li ChangHong, Cohen, R., Corporeau, C. & Simon, B. 2006. Interaction of fish oil and a glucocorticoid on metabolic responses to an oral glucose load in healthy human subjects. *British Journal of Nutrition* 95: 267-272.
- Gagliostro, G. & Chilliard, Y. 1991. Duodenal rapeseed oil infusion in early and midlactation cows. 4. In vivo and in vitro adipose tissue lipolytic responses. *Journal of Dairy Science* 74: 1830-1843.
- Gaynor, P.J., Erdman, R.A., Teter, B.B., Capuco, A.V. & Waldo, D.R. 1996. Glucose and norepinephrine challenges during abomasal infusion of *Cis* or *Trans* octadecenoates in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 79: 1590-1595.
- Gao, Z., Zhang, X., Zuberi, A., Hwang, D., Quon, M.J., Lefevre, M. & Ye, J. 2004. Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular Endocrinology* 8: 2024-2034.



- Gingras, A. A., White, P. J., Chouinard, P. Y., Julien, P., Davis, T. A., Dombrowski, L. Cou-  
ture, Y., Dubreuil, P., Myre, A., Bergeron, K., Marette, A. & Thivierge, C.M. 2007. Long-  
chain omega-3 fatty acids regulate bovine whole-body protein metabolism by promoting  
muscle insulin signalling to the Akt-mTOR-S6K1 pathway and insulin sensitivity. *Journal of  
Physiology* 579: 269-284.
- Hayirli, A., Bremmer, D.R., Bertics, S.J., Socha, M.T. & Grummer, R.R.2001. Effect of  
chromium supplementation on production and metabolic parameters in periparturient dairy  
cows. *Journal of Dairy Science* 84:1218-1230.
- Hayirli, A., Bertics, S.J. & Grummer, R.R. 2002. Effects of slow-release insulin on produc-  
tion, liver triglyceride and metabolic profiles of Holsteins in early lactation. *Journal of Dairy  
Science* 85: 2180-2191.
- Hayirli, A. 2006. The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis  
associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle. *Veterinary Re-  
search Communications* 30: 749-774.
- Grum, D.E., Drackley, J.K., Younker, R.S., LaCount, D.W. & Veenhuizen, J.J. 1996. Nutri-  
tion during the dry period and hepatic lipid metabolism of periparturient dairy cows. *Journal  
of Dairy Science* 79: 1850-1864.
- Holtenius, K., Sternbauer, K. & Holtenius, P. 2000. The effect of the plasma glucose level on  
the abomasal function in dairy cows. *Journal of Animal Science* 78: 1930-1935.
- Holtenius, K., Agenas, S., Delavaud, C. & Chilliard, Y. 2003. Effects of feeding intensity  
during the dry period. 2. Metabolic and hormonal responses. *Journal of Dairy Science* 86:  
883-891.
- Holtenius, P. & Holtenius, K. 2007. A model to estimate insulin sensitivity in dairy cows.  
*Acta Veterinaria Scandinavica* 49: 29.
- Kahn, C.R. 1978. Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a  
necessary distinction. *Metabolism* 27 suppl.2: 1893-1901.

Kessel, S., Stroehl, M., Meyer, H.H.D., Hiss, S., Sauerwein, H., Schwarz, F.J. & Bruckmaier, R.M. 2008. Individual variability in physiological adaptation to metabolic stress during early lactation in dairy cows kept under equal conditions. *Journal of Animal Science* 86: 2903-2912.

Kokkonen, T., Taponen, J., Anttila, T., Syrjala-Qvist, L., Delavaud, C., Chilliard, Y., Tuori, M. & Tesfa, A.T. 2005. Effect of body fatness and glucogenic supplement on lipid and protein mobilization and plasma leptin in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88: 1127-1141.

Lewis, G.F., Carpentier, A., Adeli, K. & Giacca, A. 2002. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocrine Reviews* 23(2): 201-229.

Mashek, D. G. & Grummer, R. R. 2003. Effects of long chain fatty acids on lipid and glucose metabolism in monolayer cultures of bovine hepatocytes. *Journal of Dairy Science* 86: 2390-2396.

Mashek, D., Bertics, S.J. & Grummer, R.R. 2005. Effects of intravenous triacylglycerol emulsions on hepatic metabolism and blood metabolites in fasted dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88: 100-109.

Muniyappa, R., Sihoon, L., Chen, H. & Quon, M.J. 2008. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *American Journal of Endocrinology and Metabolism* 294: E15-E26.

Mustad, V. A., DeMichele, S., Huang, Y. S., Mika, A., Lubbers, N., Berthiaume, N. Polakowski, J. & Zinker, B. 2006. Differential effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on metabolic control and vascular reactivity in the type 2 diabetic *ob/ob* mouse. *Metabolism, Clinical and Experimental* 55: 1365-1372.

Najjad, S. 2001. Insulin action:molecular basis of diabetes. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley& Sons, Ltd.www.els.net.

Opsomer, G., Wensing, T., Laevens, H., Coryn, M. & Kruif, A. 1999. Insulin resistance: the link between metabolic disorders and cystic ovarian disease in high yielding dairy cows? *Animal Reproduction Science* 56: 211-222.

Palmquist, D. L. & Moser, E. A. 1981. Dietary fat effects on blood insulin, glucose utilization, and milk protein content of lactating cows. *Journal of Dairy Science* 64: 1664-1670.

Patton, J., Murphy, J.J., O'Mara, F.P. & Butler, S.T. 2009. Responses of North American and New Zealand strains of Holstein-Friesian dairy cattle to homeostatic challenges during early and mid-lactation. *Animal* 3: 251-260.

Pires, J.A., Pescara, J., Brickner, A., Rio, N., Cunha, A.P. & Grummer, R.R. 2008. Effects of abomasal infusion of linseed oil on responses to glucose and insulin in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 91: 1378-1390.

Pires, J.A.A., Souza, A.H. & Grummer, R.R. 2007. Induction of hyperlipidemia by intravenous infusion of tallow emulsion causes insulin resistance in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 90: 2735-2744.

Raisio keiju 2009. Saatavilla URL= <http://www.raisio.com/www/page/1945>. Viitattu 15.11.2009.

MTT Rehutaulukot ja ruokintasuositukset 2006. MTT:n selvityksiä 106. MTT, Jokioinen.

Roche, J.R. 2006. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Animal Reproduction Science* 96: 282-296.

Shiang, K.-H. 2004. The SAS<sup>®</sup> calculations of areas under the curve (AUC) for multiple metabolic readings. Western users of SAS Software presentation, Pasadena 15.10.2004.

Saatavilla URL =

[http://www.lexjansen.com/wuss/2004/posters/c\\_post\\_the\\_sas\\_calculations\\_.pdf](http://www.lexjansen.com/wuss/2004/posters/c_post_the_sas_calculations_.pdf).

Viitattu 19.12.2009.

Stein, D. T., Stevenson, B. E., Chester, M. W., Basit, M., Daniels, M. B., Turley, S. D. ja McGarry, J. D. 1997. The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. *Journal of Clinical Investigation* 100: 398-403.

Storlien, L. H., Jenkins, A. B., Chisholm, D. J., Pascoe, W. S., Khouri, S. ja Kraegen, E. W. 1991. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega -3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes (New York)* 40: 280-289.

Strang, B., Bertics, S., Grummer, R.R. ja Armentano, L.E. 1998. Relationship of triglyceride accumulation to insulin clearance and hormonal responsiveness in bovine hepatocytes. *Journal of Dairy Science* 81: 740-747.

Van Epps-Fung, M., Williford, J., Wells, A. ja Hardy, R.W. 1997. Fatty acid-induced insulin resistance in adipocytes. *Endocrinology* 138: 4338-4345.

Winkelman, L.A., Elsasser, T.H. ja Reynolds, C.K. 2008. Limit-feeding a high-energy diet to meet energy requirements in the dry period alters plasma metabolite concentrations but does not affect intake or milk production in early lactation. *Journal of Dairy Science* 91: 1067-1079.

Wako Chemicals GmbH 2009. Saatavilla URL=  
[http://www.wakochemicals.de/DWD/\\_111327/upload/media\\_131893.pdf](http://www.wakochemicals.de/DWD/_111327/upload/media_131893.pdf).  
Viitattu 8.9.2009.

Välimäki, M. Sane, T. Dunkel, L. 2000. *Endokrinologia, Duodecim*, 736 s, Helsinki.

Xiao, C., Giacca, A., Carpentier, A. ja Lewis, G. F. 2006. Differential effects of monounsaturated, polyunsaturated and saturated fat ingestion on glucose-stimulated insulin secretion, sensitivity and clearance in overweight and obese, non-diabetic humans. *Diabetologia* 49: 1371-1379.