

Vid vilken glukosnivå frisätter kor insulin?

Ulrika Bertilsson

Handledare: Madeleine Tråvén
Inst. för Institutionen för kliniska vetenskaper, Avdelning för idisslarmedicin och epidemiologi

Biträdande handledare: Kjell Holtenius
Inst. för Husdjurens utfodring och vård

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Innehållsförteckning	2
Abstract	3
Inledning	3
Glukos	3
Negativ energibalans	4
Insulin	5
Rubbningar	6
Ketonemi och insulinresistens	6
Syfte	7
Material och metoder	7
Djur	7
Behandling	8
Provtagning och analys	8
Statistik	9
Resultat	9
Diskussion	12
Litteraturförteckning	14
Tackord	14

ABSTRACT

Bertilsson, U. *Insulin response related to blood glucose level in dairy cows.*
Examensarbete, Veterinärprogrammet.
ISSN 1652-8697. 2006:11.

Six cows were subjected to an intravenous glucose tolerance test (GTT) to evaluate the amount of glucose that is needed to stimulate the release of insulin from pancreas. Four of the cows were in early lactation and two were non-lactating and not pregnant. Series of blood-samples were collected to analyze the concentration of insulin and glucose in the blood. The cows were given lower levels of glucose than have been used in earlier glucose tolerance tests. The levels of glucose given were 7,5 mg/kg BW, 15 mg/kg BW, 30 mg/kg BW and 50 mg/kg BW. It was shown that only a small increase in blood glucose was needed to stimulate the release of insulin from pancreas. A rise of 0,25 mmol/l of blood glucose triggered release of insulin. The non-lactating cows had higher levels of glucose and insulin than the lactating cows, both before and after treatment. Two different tests were used to analyze insulin; Coat-A-Count Insulin radioimmunoassay (DPC Los Angeles, USA) and Mercodia, Bovine Insulin ELISA (Mercodia AB, Uppsala). The results from Mercodia were higher and detected lower levels of insulin compared to Coat-A-Count.

Key words: glucose tolerance test, insulin, cow and lactation.

INLEDNING

På 1940-talet var svenska mjölkors avkastning 3500 kg mjölk per år, idag är motsvarande siffra nästan 9000 kg. Detta gäller kor anslutna till kokontrollen (Svensk Mjölk, 2005).

Kroppens bränsle består av kolhydrater, aminosyror och fett. I idisslarens våm sker jäsning av kolhydrater, varifrån den största mängden energi fås (för referens se Björnhag, 1989). Kons foderstat består till ca 70% av kolhydrater som bryts ned i våmmen med hjälp av mikrober som bildar flyktiga fettsyror; ättiksyra 60-70%, propionsyra 15-25% och smörsyra 10-20%. Dessa flyktiga fettsyror (VFA=volatile fatty acids) tas upp via våmväggen till blodet. Ättiksyra och smörsyra används som energikälla samt som substrat för mjölkfettsyntesen. Propionsyra fungerar som substrat för glukosyntes i levern via glukoneogenesen i levern (Herdt, 2004). Vid snabb jäsning av lättillgängliga kolhydrater som finns i tex. spannmål, ökas bildningen av propionsyra (Björnhag, 1989).

Glukos

Den lakterande idisslaren behöver glukos främst till mjölksyntesen och till nervsystemet. Idisslares hjärna kan ej utnyttja andra källor än glukos som energi. Under sen dräktighet och under en stor del av laktationen är behovet av glukos stort (Swenson & Reece, 1993), nivån i blodet är lägre i tidig laktation jämfört med sintidsperioden (för referens se Radostits, 2000). Mjölkproduktion kräver stora mängder kolhydrater i form av glukos. Levern är det viktigaste organet för att reglera glukosnivån i blodet (Herdt, 2000).

Negativ energibalans

I tidig laktation är högvakastande mjölkkor i negativ energibalans (NEB) eftersom foderintaget inte ökar i takt med stigande mjölkproduktion. De flesta kor klarar av NEB genom metabolisk anpassning. Kolhydrater kan tillverkas från protein via glukoneogenesen. Det finns risk för förbrukning av kroppsprotein vid NEB (Herdt, 2000). Anpassning till negativ energibalans innefattar mobilisering av lagrad energi, ändring av substratanvändning och omvandling av metaboliter. De viktigaste organsystemen vid anpassningen är levern och fettvävnaden, samt skelettmuskulaturen och juvret. I adipocyter finns energi lagrat i form av triglycerider, dessa består av tre långkedjade fettsyror bundna till glycerol. Vid nedbrytning av triglycerider frigörs fria fettsyror (NEFA = non esterified fatty acids) och glycerol till blodet, denna nedbrytning heter lipolys. Bildning av triglycerider heter lipogenes. Lipogenes och lipolys sker hela tiden i adipocyter. Juvervävnad kan vid NEB ej ändra sina behov vad gäller glukos, utan kan enbart kompensera med minskad mjölkproduktion. Glukos krävs för laktosyntes och aminosyror behövs vid syntes av protein i mjölken. Juvrets glukosupptag påverkas ej av insulinivån i blodet (Herdt, 2000). Flera aminosyror kan användas som prekursorer för glukoneogenesen, aminosyror från foder och skelettmuskulatur används för detta i levern (Bild 1).

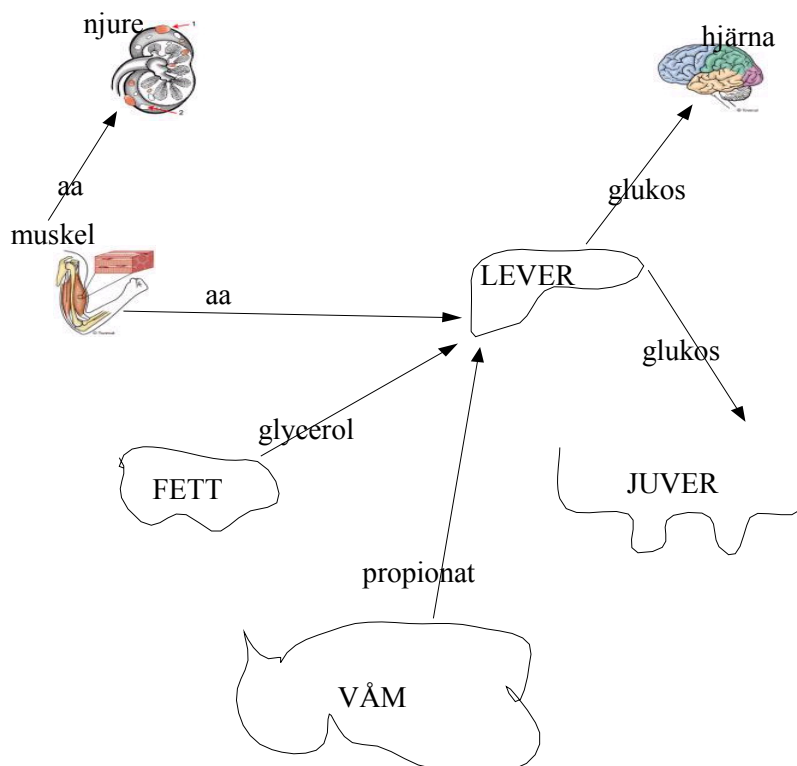


Bild 1. Bildning och utnyttjande av glukos vid negativ energibalans. Glykogen aminosyror (aa) kan stå för 15-20% av glukosbehov. Propionat står för 50-60% av glukoskällan hos nykalvad.

När det finns större tillgång på glukos och dess prekursorer än vad som behövs lagras kolhydrater in i levern i form av glykogen, men denna lagring är begränsad. När behovet av energi överstiger tillgången, frisätts NEFA från fettvävnad, levern tar hand om en del av dessa. I levern kan NEFA ombildas till ketonkroppar i

hepatocyternas mitokondrier eller återesterfieras till triglycerider i cytosolen. När lipidmobiliseringen är omfattande och därmed NEFA-koncentrationen i blodet är hög kan mycket fett lagras in i levern i form av triglycerider. Detta sker främst dagarna runt kalvning. Triglycerider kan transporteras från levern bundna till transportproteiner, very low density lipoproteins (VLDL). Hos den lakterande kon tas huvuddelen av de till VLDL bundna triglyceriderna upp av juvret för att ingå i mjölfettet (Bild 2).

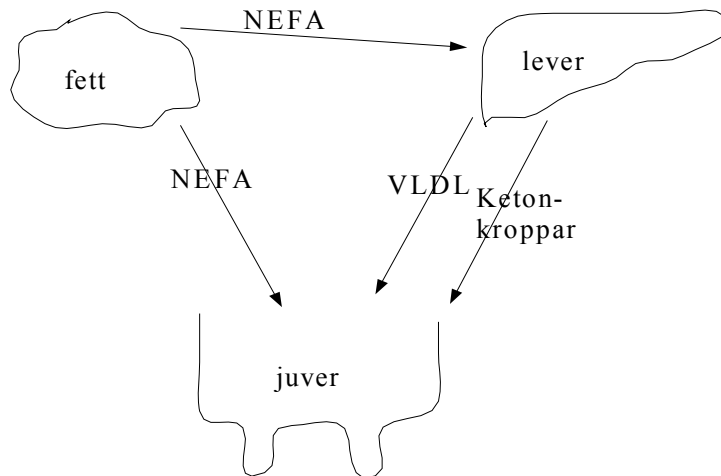


Bild 2. Negativ energibalans efter kalvning. Lipider mobiliseras från fettvävnad.

Vid anpassning till NEB har tillgång på glukos, ketonkroppar och NEFA stor betydelse. I början på laktationen när glukos är en bristvara mobiliseras NEFA från adipocyter. Tillgång på glukos och NEFA har stor inverkan på levermetabolism och systemisk metabolism (Herdt, 2000). Produktionen av ketonkroppar är i allmänhet som högst under den första månaden efter kalvning. Då är insulinnivån i blodet låg, detta stimulerar lipolys i fettvävnad (Holtenius, 1996). Detta innebär att NEFA transporteras in i mitokondrier vilket stimulerar produktion av ketonkroppar. Ketonkroppar fungerar som energi i muskelvävnad och sparar därmed på glukos. Dessutom hämmar ketonkroppar lipolys och då frisätts mindre NEFA till blodet (Herdt, 2000).

Insulin

Det är inte nivån av glukos i blodet som stimulerar frisättning av insulin utan transporten och metabolismen av glukos in i pankreas β -celler (Holtenius & Holtenius, 1996). Frisättning av insulin stimuleras även av aminosyror, hormoner och vissa läkemedel. Insulins frisättning hämmas av hypoglykemi samt av flera läkemedel (Kaneko et al 1997). Insulin ökar användningen av glukos i muskelvävnad samt hämmar glukoneogenesen i levern, detta leder till minskad halt av glukos i blodet. I fettvävnad stimulerar insulin lipogenes och hämmar lipolys, då minskar frisättningen av NEFA till blodet. I levern ger insulin minskad ketogenes. Dessutom stimulerar insulin triglyceridsyntes. Vid NEB sjunker nivåerna i blodet av glukos och propionsyra, då sjunker även insulin (Herdt, 2000).

Rubbingar

Nykalvade kor riskerar att utveckla ketos eftersom de vanligtvis är i negativ energibalans eftersom foderintaget inte motsvarar behovet för mjölkbildning. Idisslare har normalt ketonkroppar i blodet, men vid höga halter påverkas kon och hon kan få minskad aptit, viktminskning och lägre mjölkproduktion, det förekommer likaså nervösa symptom (Duffield, 2000). Risken att utveckla ketos är större om kon under sinperioden överutfodras och är över normalhull (Holtenius et al, 2003; Duffield, 2000). Kor som utfodras med för höga nivåer under sinperioden och då blir överviktiga har högre glukos- och insulinnivåer i blodet (Holtenius et al, 2003). Man har visat att förhöjda nivåer av ketonkroppar ofta förekommer i samband med metrit, löpmagsförskjutning, mastit och hämning av vita blodkroppars funktion (Duffield, 2000). Kor i tidig laktation har en måttlig insulinresistens i fettvävnad och muskler, därmed gynnas mobilisering av NEFA och aminosyror samt hushållande med glukos. NEFA i sin tur bidrar till insulinresistens genom att hämma glukosupptag i muskler och fettvävnad (Holtenius et al, 2003). Stress till följd av uttorkning och smärta kan orsaka hyperglykemi (Lorenz, 2000). Förhöjda nivåer av glukos och insulin i blodet ger en nedsatt motilitet och tömningshastighet av löpmagen, då ökar risken för utveckling av löpmagsförskjutning (Holtenius et al, 2000). Nötkreatur har normalt lägre glukos- och insulinnivå i blodet jämfört med enkelmagade djur (Tabell 1).

Tabell 1. Normalvärden i blodet

<i>Djurslag</i>	<i>Nöt</i>	<i>Gris</i>	<i>Hund</i>
Glukos, mmol/l	2.5-4.2	4.7-8.3	3.61-6.6
Insulin, μ IU/ml	0-6.0		6.0-24

Källa: (Kaneko, 1997)

Ketonemi och insulinresistens

Man kan dela in hyperketonemi i två former: Typ I (hypoglykemisk, hypoinsulinemisk form) och Typ II (hyperglykemisk, hyperinsulinemisk form). Typ I uppstår när mjölkproduktionen är så hög att behovet av glukos överskrider kapaciteten att tillverka tillräckligt med glukos. Nivåerna av glukos och insulin är låga och nivåerna av NEFA och ketonkroppar höga i blodet. Energibehovet tillfredställs genom ökad lipolys, ketogenes och användning av ketonkroppar. Denna hypoglykemiska, klassiska typ av ketos uppstår vanligtvis 3-6 veckor efter kalvning. Dessa kor svarar med endast låga nivåer av glukos och insulin vid injektion av glukagon (Holtenius & Holtenius, 1996). Typ II hyperketonemi uppstår tidigare i laktation, ofta i kombination med annan sjukdom såsom metrit, fång, mastit. Dessa kor svarar med höga nivåer av glukos och insulin vid glukagoninjektion. De kan ha en varierande grad av fett inlagrat i levern och insulinresistens. Överutfodring under sinperioden predisponerar för utveckling av Typ II hyperketonemi. Denna överutfodring kan leda till störningar i den metaboliska anpassningen vid tiden runt kalvning. Kor utsatta för stress, tex. sjukdom runt kalvning har en ökad transport av NEFA till levern, samtidigt är blodnivåerna av glukos och insulin förhöjda vilket leder till ökad fettsyntes och därmed ökar risken för utveckling av fettlever (Holtenius & Holtenius, 1996).

Insulin som utsöndras från β -cellerna i pankreas tas upp av levern till 60% hos lakterande kor och till 85% hos icke lakterande kor (Lomax et al, 1979). Fettsyror och triglycerider hämmar leverns avlägsnande av insulin vilket leder till hyperinsulinemi. När då insulin i lägre grad binds till levern kan glukosproduktionen öka, detta förlopp liknar insulinresistens hos människa (Holtenius & Holtenius, 1996). Vid glukostoleranstest hos nöt stiger nivån av glukos och insulin i blodet (Anderson et al, 2000; Holtenius et al, 2003). Tjurarna i Anderson och medarbetares försök fick 258 mg glukos per kg kroppsvikt. Kor i sinperiod svarar med högre nivåer av både glukos och insulin jämfört med lakterande kor vid GTT (Holtenius et al, 2003). Glukosgivan i Holtenius och medarbetares (2003) undersökning var 150 mg/kg.

Syfte

Vid tiden efter kalvning är sjukdomar som mest vanliga hos mjölkkor, då har förändringar i ämnesomsättningen betydelse (Holtenius, 2004). Etiologin till detta är multifaktoriell och ej helt klarlagd. Nivån av glukos och insulin i blodet har betydelse. En del kor utvecklar hyperglykemi, men vilken glukosnivå som skall anses normal under laktationens första del är ej helt klarlagd. En faktor som spelar in i bedömningen är hur hög blodglukosökning som behövs för frisättning av insulin. Syftet med denna undersökning var att ta reda på hur mycket glukos som behövs för att insulin ska frisättas från pancreas β -celler till cirkulationen. Därför gavs lägre dosnivåer än vad som gjorts i tidigare försök. Denna undersökning bidrar med information som kan vara till hjälp för förståelse av idisslares ämnesomsättning.

MATERIAL OCH METODER

Djur

I försöket ingick sex kor av rasen SRB (Tabell 2). Två var ej dräktiga sinkor, dessa var uppstallade på Institutionen för kliniska vetenskaper, Avdelning för idisslarmedicin och epidemiologi, SLU. De två sinkorna provtogs under december 2004. Övriga fyra kor var uppstallade på Institutionen för husdjurens utfodring och vård (HUV), Kungsängen stall, SLU. Dessa lakterande kor provtogs under april 2005. Provtagningarna på de lakterande korna gjordes inom fyra veckor efter kalvning utom för ko 915, hon provtogs inom sex veckor efter kalvning.

Tabell 2. Kor som ingick i försöket

Ko	528 Fanny	792 Greta	915 Greta	1000 Girse	939	1116
Kalvat	050321	050331	050304	050324	030607	040121
Född	930825	961225	981118	000103	99	01
Fader	609 Ollas	882 Torpane	907 T Bruno	307 Flaka		
Vikt, kg	605	587	660	595	609	614

Sinkornas foderstat bestod av grovfoder; halm och hö. De lakterande korna fick ensilage, ca 12-14 kg ts per dag (37% ts) samt kraftfoder, ca 10 kg dagligen. De mjölkades två gånger dagligen (Tabell 3). Samtliga kor i försöket stod uppboundna.

Tabell 3. Medelavkastning per dygn under provtagningsperioden 050404 tom 050415

Ko nr	528	792	915	1000
Avkastning, kg mjölk	37,2*	35,8	47,1	28,1

* Enbart resultat från provmjölkning den 18-19/4-05

Behandling

Alla kor fick fyra olika dosnivåer av glukos intravenöst vid fyra olika tillfällen. Försöksupplägget var romersk kvadrat. För att pröva ut lämpliga dosnivåer användes i ett första steg de två sinkorna. De lakterande korna valdes ut med hänvisning till att de skulle vara relativt nykalvade. För att inte behandlingarna skulle interferera med varandra bestämdes att det skulle vara minst en dags uppehåll mellan behandlingarna. Varje ko fick vid olika tillfällen 7,5 mg, 15 mg, 30 mg samt 50 mg/kg glukos med undantag av ko 939 som fick 75 mg/kg som högsta nivå. Det lottades i vilken ordning de skulle få sin respektive behandling. Glukos (500 mg/ml) injicerades via permanentkateter i v.jugularis. Injektionen skedde under 45 sekunder. Tiden för provtagningarna mättes från att infusionen var slutförd. För att volymen skulle vara lika stor vid de olika nivåerna späddes glukoslösningen med natriumklorid (9 mg/ml). Därefter spolades kanylen ren med natriumklorid.

Provtagning och analys

Blodprov samlades via permanentkatetern; två prov innan glukosinfusion för att få kons basalvärde för dagen, samt 2, 4, 8, 12, 18, 25, 34, 45 och 60 minuter efter infusion. Ett litiumheparinrör fylldes vid varje provtagning. Efter varje samling spolades kanylen med natriumklorid. Rören centrifugerades och plasman pipetterades av och förvarades kyld fram till analys av glukos samma dag. För analys av glukos användes Kodak Ektachem DT System, Eastman Kodak Company. Därefter frystes plasman för senare analys av insulin. Denna analys skedde på Avdelning för bilddiagnostik och klinisk kemi, SLU med hjälp av Coat-A-Count Insulin radioimmunoassay (DPC Los Angeles, USA). Vid denna metod används antikroppar mot humant insulin och minsta detektionsnivå är 2.0 μ IU/ml. Värden som hamnade under denna nivå sattes alla till 1.0 μ IU/ml. Ett nytt kit för att analysera insulin hos nöt användes för att jämföra analysresultaten på proverna

från de lakterande korna. Antikroppar mot bovint insulin används i den nya analysen. Detta kit heter Mercodia, Bovine Insulin ELISA (Mercodia AB, Uppsala). Mercodias antikroppar binder insulin på två ställen medan Coat-A-Count binder till ett ställe.

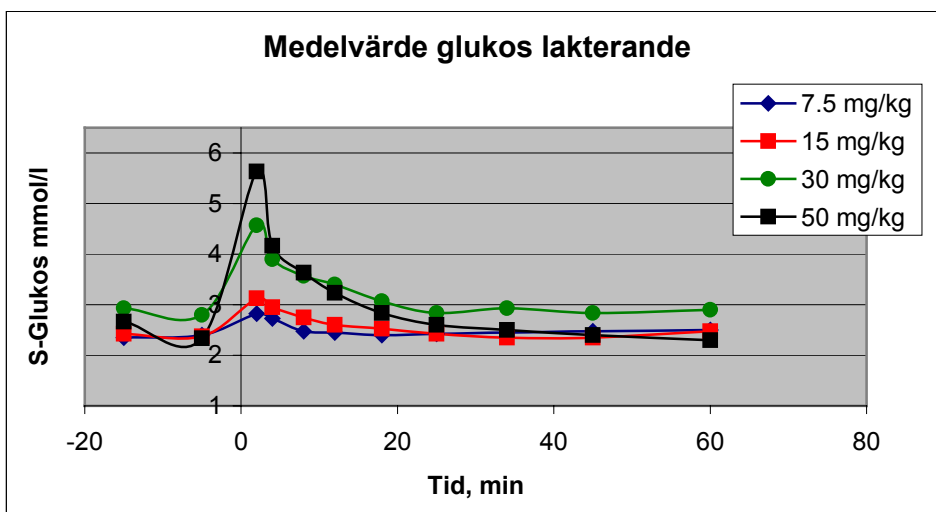
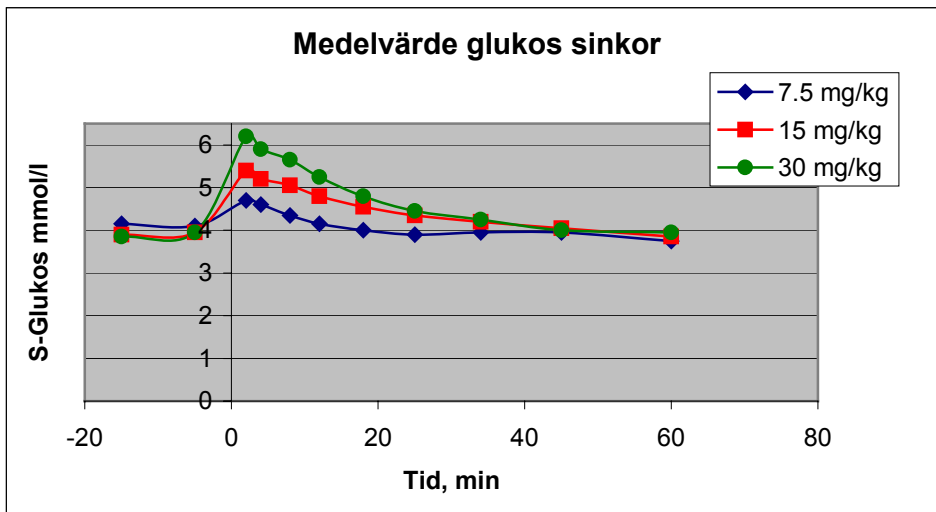
Statistik

För statistisk analys av resultaten från de lakterande korna användes variansanalys. Medelvärde för de olika behandlingarna räknades ut. Dessutom räknades Area Under Curve (AUC) ut för förändringen av glukos och insulin. Detta gjordes enligt formeln:

$$\text{AUC} = ((\text{medelvärde konc 1} + \text{medelvärde konc 2})/2) * \text{tid}$$

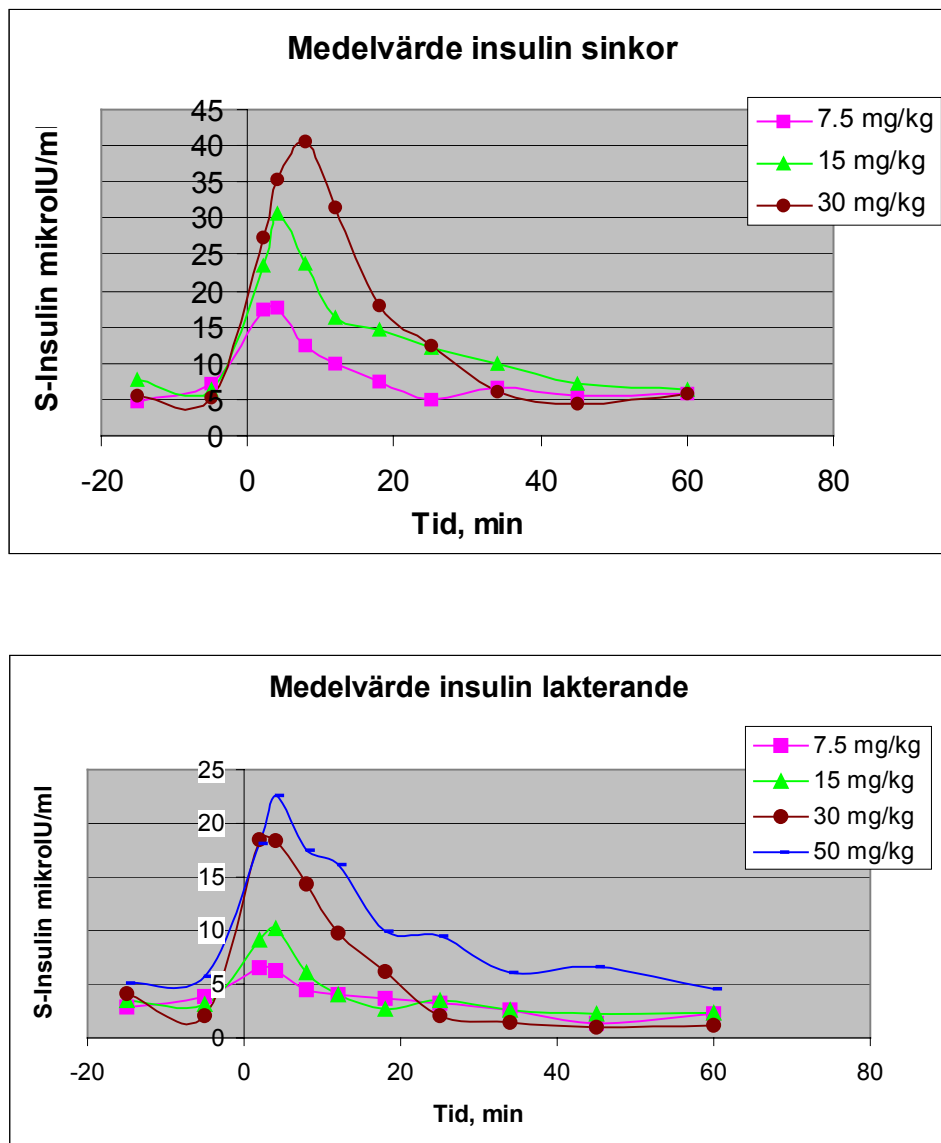
RESULTAT

Samtliga kor i försöket fick en mätbar ökning av glukos samt svarade med ökade nivåer insulin vid infusion av glukos. Sinkorna hade generellt högre nivåer av glukos och insulin, både före och efter behandling. Vid de högre behandlingsnivåerna ökade glukos mer och svaret av insulin var större och kvarstod längre jämfört med vid de lägre behandlingsnivåerna (Fig 1 och Fig 2). Nollvärdena hos de lakterande korna för glukos varierade mellan 2,0-3,0 mmol/l innan den lägsta glukosgivan (7,5 mg/kg). Den minsta ökningen av blodglukos som stimulerade insulinfrisättning låg mellan 0,25-1,0 mmol/l. Under hela försöket låg de lakterande kornas glukosnollvärden mellan 1,8 – 4,0 mmol/l. Motsvarande värden för sinkorna varierade mellan 3,7 – 4,3 mmol/l.



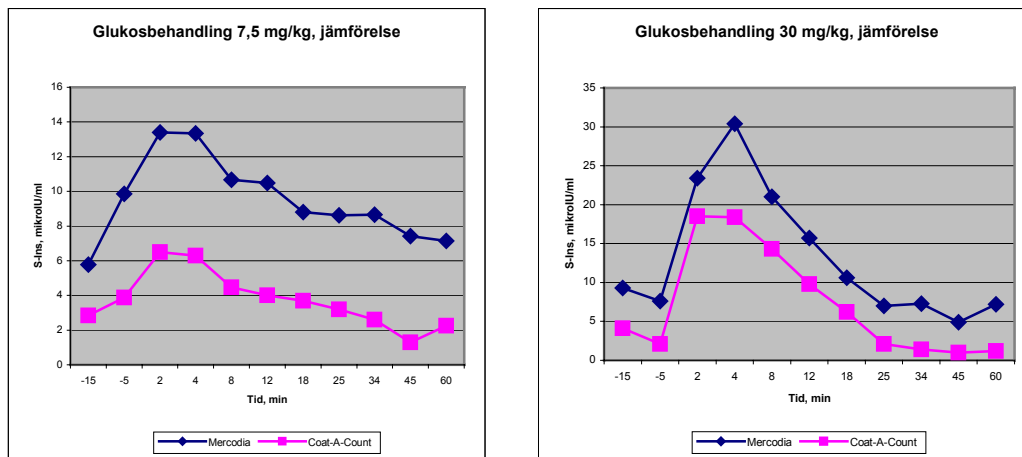
Figur 1. Medelvärde glukos efter glukosinfusion hos icke-lakterande och lakterande kor.

Det enskilt högsta insulinvärdet bland sinkorna var enligt Coat-A-Count vid glukosgiva 7,5 mg/kg 21,3 μ IU/ml. Motsvarande värde för de lakterande korna var 11,6 μ IU/ml.



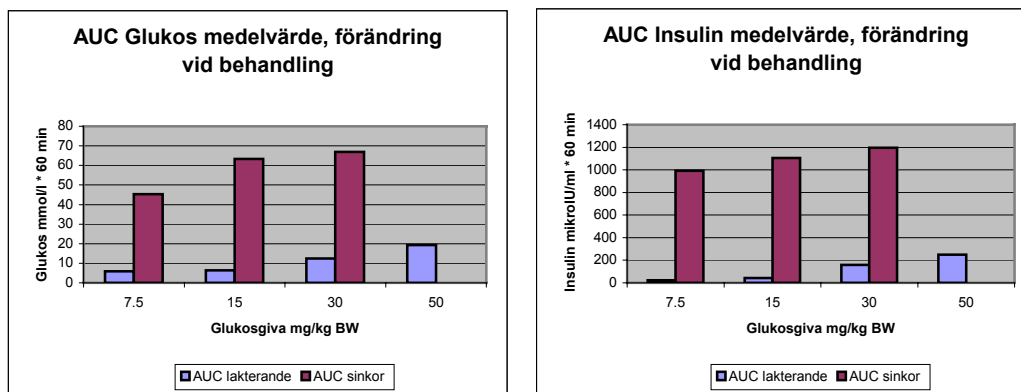
Figur 2. Medelvärde insulin efter glukosinfusion icke-lakterande respektive lakterande kor, OBS! olika skalor. Insulin analyserat med metoden Coat-A-Count.

Variansanalys av resultaten från de lakterande korna visade signifikant skillnad ($p < 0,001$) mellan behandlingsnivåerna, mellan provtagningstidpunkterna samt mellan de olika korna. Detta gäller både glukos- och insulinnivåerna i blodet. Vid jämförelse mellan resultaten från Mercodia och Coat-A-Count följer de samma trend vad gäller kurvornas utseende. Mercodia visar genomgående på högre insulinvärden (Fig. 3). Mercodia detekterade tydliga insulinsvar vid de två lägsta behandlingsnivåerna hos ko 792 där samtliga prover låg under detektionsgränsen i Coat-A-Count.



Figur 3. Jämförelse resultat av insulin med de olika analyser; Mercodia och Coat-A-Count. OBS! olika skalor.

Area Under Curve (AUC) räknades ut på förändringen i blodvärde både vad gäller glukos och insulin, separat för sinkor och lakterande. Skillnaderna mellan lakterande kor och sinkor var mycket stora både för glukos och insulin AUC (Fig. 4). Statistisk analys gjordes ej på grund av gruppstorleken.



Figur 4. AUC på förändring av blodvärde för glukos respektive insulin.

DISKUSSION

Eftersom glukos används för laktosyntes i juvret är glukoshalten i blodet högre hos sinkor jämfört med lakterande kor (Holtenius et al, 2003) vilket också visades i detta försök. Det förelåg skillnader mellan de lakterande korna i glukos- och insulinnivå före och efter behandling. Skillnader fanns även i utgångsvärden vid olika tillfällena för samma ko. Därför skulle undersökning med fler kor vara av värde. Variationerna kan förklaras med individskillnader, tid efter kalvning, stress mm. Det skulle kunna vara av värde att analysera fler parameterar, som exempelvis cortisol för att se om variationer kan bero på stress. Som tidigare nämnts användes sinkorna för att prova ut nivåerna. Vid första provtagningen fick

ko 939 75 mg/kg glukos. Eftersom denna nivå gav ett väldigt högt insulinsvar sänktes nivåerna därefter. Generellt krävdes en mycket liten stegring av blodglukos för att trigga insulinfrisättning. Samtliga lakterande kor och sinkor frisatte insulin vid den lägsta glukosgivan (mätt med Mercodiametoden), vilket motsvarade endast 4,5 gram glukos till en ko som väger 600 kg. Glukosnivån i blodet beror på många faktorer och är ett resultat av en jämvikt mellan flöde till och från cirkulationen. När glukosnivån i blodet stiger över visst tröskelvärde utsöndras glukos via njurarna, detta tröskelvärde är för nöt 5,4-5,7 mmol/l jämfört med hund vars tröskelvärde ligger på 10,0-12,2 mmol/l (för referens se Kaneko, 1997). Fyndet att nöt frisätter insulin redan vid mycket låga blodglukosnivåer stöder hypotesen att nöt kan anses ha hyperglykemi vid en betydligt lägre blodglukoshalt än enkelmagade djur.

Mercodia visade sig vara en mer känslig metod och kunde detektera lägre värden jämfört med Coat-A-Count. De insulinvärden som de lakterande korna hade innan glukosgiva låg mellan 2,2 – 26,6 μ IU/ml för Mercodia och mellan 2,1 – 10,3 μ IU/ml för Coat-A-Count. De svaga insulinsvaren som enbart kunde detekteras med Mercodiametoden uppvisade en kinetik som man kan förvänta sig vid ett insulinsvar. Den högre känsligheten kan delvis bero på att Mercodia använder antikroppar mot bovin insulin. Mercodia är därför intressant och kan bli användbar i framtiden.

Ko 1000 mårde vid försökets början bra, men fick sämre och sämre aptit under tiden. Hennes avkastning sjönk från cirka 40 kg per dygn vid försökets början till ungefär 20 kg i slutet av försöket. Hon behandlades med blodsockerhöjande energibalans, men trots detta blev hon ej bättre. Hon undersöktes av veterinär 2004-04-14 som behandlade ko 1000 med kortison (Vorenvet (1 mg/ml), 15 ml) samt Magnesiumtrisilikat. Enligt Radostits (2000) ger behandling med kortison hyperglykemi inom 24 timmar. Detta tros bero på omdistribution av glukos i kroppen snarare än ökad glukoneogenes. Hyperglykemin kan kvarstå i 4-6 dagar om dosen är 10 mg dexamethason. Däremot anger Ganrot (1997) glukoneogenesen som orsak till höjningen av blodsockret vid kortisongiva. Bakgrunden är en hämning av proteinsyntesen, då fås ett nettoutflöde av aminosyror från perifer vävnad till cirkulationen. Aminosyror används vid glukoneogenesen i levern. Dessutom hämmar glukokortikoider utnyttjandet av glukos i extrahepatisk vävnad och stimulerar lipolys i fettvävnad. Ko 1000 svarade med lägre nivåer av insulin vid den högsta nivån av behandling jämfört vid de två lägsta nivåerna, då hade inappetensen pågått i några dagar. Dagen efter att hon behandlats med kortison fick hon näst högsta nivån av behandling, dvs. 30 mg/kg och svarade med väldigt höga insulinnivåer. Då var hennes högsta insulinvärde 35,3 mmol/l jämfört med de andra lakterande vars motsvarande värde låg mellan 12,0 och 25,8 mmol/l. Denna ko exkluderades i försökets två högsta behandlingsnivåer (30 mg/kg samt 50 mg/kg) eftersom hon ej ansågs vara frisk. Hon kan ha lidit av en primär acetonemi.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Anderson, D. E. Monke, D. R. Silveira, F. Ayars, W. Rings, D. M. 2000. Determination of serum insulin concentration during intravenous glucose tolerance testing of healthy bulls. *Am J Res.* 61:61-63.
- Björnhag, G. et al. 1989. *Husdjur – ursprung, biologi och avel*. LTs förlag Stockholm, 220-222.
- Duffield, T. 2000. Subclinical Ketosis in Lactating Dairy Cattle. *The veterinary clinics of North America* 16, 2, 231-253.
- Herd, H. T. 2000. Influences on the Etiology of Ketosis and Fatty Liver. *The veterinary clinics of North America* 16, 2, 215-230
- Holtenius, P. & Holtenius, K. 1996. New Aspects of Ketone Bodies in Energy Metabolism of Dairy Cows: A Review. *J. Vet. Med. A* 43, 579-587.
- Holtenius, K., Jacobsson, S. O., Holtenius, P. 1998. Effects of intravenous infusion of glucose and pancreatic glucagon on abomasal function in dairy cows. *Acta Vet Scand*;39, :291-300.
- Holtenius, K., Sternbauer, K., & Holtenius, P. 2000. The effect of the plasma glucose level on the abomasal function in dairy cows. *J. Anim. Sci.*78: 1930-1935
- Holtenius, K. Agenäs, S. Delavaud, C. Chilliard, Y. 2003. Effects of Feeding Intensity During the Dry Period. 2. Metabolic and Hormonal Responses. *J. Dairy Sci.* 86: 883-891
- Holtenius, K. 2004. Ämnesomsättningen kring kalvning – varför blir korna sjuka. *Veterinärmötet*, 171-175.
- Ganrot, PO. Grubb, A., & Stenflo, J. 1997. *Laurells Klinisk Kemi*, 7:e upplagan. Studentlitteratur, 298.
- Geishauser, T. Leslie, K. & Duffield, T. 2000. Metabolic Aspects in the Etiology of Displaced Abomasum. *The veterinary clinics of North America* 16, 2, 255-263.
- Kaneko, J. Jerry. Harvey, John W. Bruss, Michael L. 1997. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Fifth Edition, 58-81, Appendix.
- Lomax, M. K. Baird, G. D. Mallinson, C. B. & Symonds, H. W. 1979. Differences between Lactating and Non-Lactating Dairy Cows in Concentration and Secretion Rate of Insulin. *Biochem. J.* (1979) 180, 281-289.
- Lorenz, I. 2000. Retrospective study of serum glucose concentration in cattle with mucosal disease. *J Vet Med A Physiol Clin Med.* 47:489-93.
- Radostits, O. M. Gay, Clive C. Blood, D. C. & Hinchcliff, K. W. 2000. *Textbook of Veterinary Medicine*, 9th edition WB Saunders. 1420, 1458-1459.
- Svensk mjölk. 2005-10-12. Anslutning och medelavkastning i officiell kokontroll. www.statistik.svenskmjolk.se/tabels/anslutning05.pdf
- Swenson, M. J. Reece & William, O. 1993. *Dukes' Physiology of Domestic Animals*, eleventh edition, 493.

Tackord

Stort tack till Stiftelsen Valloxen och Gunnar Hedlunds Stipendiefond som genom sina bidrag gjort mina undersökningar möjliga. Tack till mina handledare Madde och Kjell. Jag vill även tacka korna som deltagit i försöket och Sigrid Agenäs som lånade ut "sina" kor till mitt försök.

