Univerza v Ljubljani
Veterinarska fakulteta

Jernej Šmigoc

VPLIV OKSIDATIVNEGA, METABOLNEGA IN VROČINSKEGA STRESA NA REPRODUKCIJSKE PARAMETRE GOVEDA

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2023

Univerza v Ljubljani
Veterinarska fakulteta

UDK 636.2:616-036:615.03:618.4:577.161.3:546.23(043.3)

Jernej Šmigoc, dr. vet. med.

VPLIV OKSIDATIVNEGA, METABOLNEGA IN VROČINSKEGA STRESA NA REPRODUKCIJSKE PARAMETRE GOVEDA

Doktorska disertacija

THE IMPACT OF OXIDATIVE, METABOLIC, AND HEAT STRESS ON REPRODUCTIVE PARAMETERS OF CATTLE

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2023

Jernej Šmigoc

Vpliv oksidativnega, metabolnega in vročinskega stresa na reprodukcijske parametre goveda.

Delo je bilo opravljeno na Veterinarski fakulteti v Ljubljani, na Inštitutu za varno hrano, krmo in okolje Veterinarske fakultete, na Kliniki za reprodukcijo in velike živali ter na kmetiji Šmigoc v Podlehniku.

Javni zagovor je bil opravljen:

Mentor: prof. dr. Janko Mrkun

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Jožica Ježek (Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta)
Član: prof. dr. Marjan Kosec (Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta)
Član: prof. dr. Janez Salobir (Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta)
Član: izr. prof. dr. Milan Maletić (Univerza u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine)

Izjava o delu:
Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in da nisem kršil avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu.

IZVLEČEK

Ključne besede: reprodukcija, oksidativni stres – učinki zdravil, toplotni stres – učinki zdravil, metabolni stres – učinki zdravil, vitamin E – farmakologija – terapevtska raba – kri, selen – farmakologija – terapevtska raba – kri, antioksidanti – metabolizem, glutation peroksidaza – analize, superoksid dismutaza – analize, peripartalno obdobje, prenos zarodka, govedo.

Namen doktorske naloge je bil preveriti, ali bo imelo preventivno dodajanje vitaminov AD_3E oz. kombinacije vitamina E (vit. E) in selena (Se) kravam molznicam v obporodnem obdobju pozitivne učinke na zmanjševanje metabolnega, oksidativnega in vročinskega stresa ter njegovih posledic na zdravje in reprodukcijske parametre. Določili smo koncentracijo vit. E in Se, aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) in glutation peroksidaze (GPX) ter vrednosti skupne antioksidativne kapacitete (TAS), neesterificiranih maščobnih kislin (NEFA) in beta-hidroksibutirata (BHB) v krvni plazmi pri tretirani skupini molznic (N=16) in kontrolni skupini (N=18) v štirih zaporednih merjenjih v razponu od enega tedna pred porodom do štirih tednov po porodu. Rezultati kažejo, da je bil dodatek vit. E in Se za krave ob porodu učinkovit, saj smo v tretirani skupini zabeležili vzdrževanje želene ravni vitaminov v času telitve ter zmanjšanje upada v začetku laktacije. Pri kontrolni skupini smo z napredovanjem laktacije opazili postopno upadanje antioksidativne aktivnosti oz. parametra TAS; pri tretirani skupini upad ni bil tako izrazit. Dodajanje Se in vit. E je povečalo učinkovitost odziva antioksidativne zaščite; aktivnost encimov SOD in GPX se je v tretirani skupini v preiskovanem obdobju postopoma povečevala. Najvišjo povprečno vsebnost NEFA in BHB v krvni plazmi smo v obeh skupinah zabeležili dva tedna po porodu, vendar je bila pri tretirani skupini koncentracija NEFA in BHB pomembno nižja. Pri tretirani skupini molznic smo po porodu diagnosticirali pomembno manj primerov zaostale posteljice, endometritisa in ovarialnih cist; čas, potreben za involucijo maternice, je bil pomembno krajši; boljša je bila uspešnosti prve osemenitve ter dolžina servisnega intervala. V drugem delu raziskave smo nadalje preverjali, ali se preventivno dodajanje vit. E in Se povezuje tudi z uspešnostjo embriotransferja pri kravah. Primerjava števila uspelih implantacij zarodkov med kontrolno in tretirano skupino kaže v prid slednje, saj je v tej skupini 64,7 % telic ostalo brejih po transferu zarodka ter donosilo zdrava teleta. V kontrolni skupini je bila implantacija uspešna v 41,2 %. V raziskavi smo uspeli dokazati, da lahko s preventivnimi ukrepi blažimo učinke oksidativnega stresa in krepimo sposobnost organizma za boljše odstranjevanje reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) in izboljšujemo energijski status goveda.

ABSTRACT

Keywords: reproduction, oxidative stress – drug effects, heat stress – drug effects, metabolic stress – drug effects, vitamin E – pharmacology – therapeutic use – blood, selenium – pharmacology – therapeutic use – blood, antioxidants – metabolism, glutathione peroxidase – analysis, superoxide dismutase – analysis, peripartum period, embryo transfer, cattle.

The purpose of the doctoral thesis was to verify whether preventive supplementation of vitamins AD_3E or a combination of vitamin E and selenium to dairy cows during the peripartum period would have a positive impact on reducing metabolic, oxidative, and heat stress and its effects on health and reproductive parameters. We determined the concentration of vit. E and Se, SOD and GPX activity and TAS, NEFA in BHB values in blood plasma in the treated group of dairy cows (N=16) and the control group (N=18) in four consecutive measurements, ranging from one week before parturition to four weeks after parturition. Supplementation of vit. E and Se was effective for cows at parturition since the measurements show that the desired levels of vitamins were maintained during calving and there was a reduction of decline at the beginning of lactation. In the case of the control group, the progressive deterioration of the antioxidant activity, or the TAS parameter, was observed with the development of lactation. Supplementation of Se and vit. E. increased the efficiency of the antioxidant protection response, and the activity of SOD and GPX enzymes gradually increased in the treated group throughout the monitored period. The highest average content of NEFA and BHB in blood plasma was recorded in both groups two weeks after delivery. However, the concentration of NEFA and BHB was significantly lower in the treated group. In the treated group of dairy cows, significantly fewer cases of retained placenta, endometritis, and ovarian cysts were diagnosed after delivery. The required time for uterine involution was significantly shorter in the treated group. There was also a difference in the success rate of the initial insemination and the length of the service interval. In the second part of the research, we further examined whether the preventive supplementation of vit. E and Se can also be associated with the success rate of embryo transfer in cows. The number of successful embryo implantations was higher in the treated group. In this group, 64.7% of heifers remained pregnant and gave birth to healthy calves. In the control group, the implantation success rate was 41.2%. In our study, we were able to demonstrate that preventive measures can hinder the effects of oxidative stress and strengthen the ability of the organism to remove ROS and improve the energy status of cattle better.

KAZALO VSEBINE

IZVLEČEK ... 4
ABSTRACT ... 5
KAZALO VSEBINE ... 6
KAZALO SLIK ... 9
KAZALO TABEL ... 11
SEZNAM OKRAJŠAV ... 14
1 UVOD ... 15
1.1 NAMEN DELA ... 16
1.2 HIPOTEZE ... 18
2 PREGLED LITERATURE ... 20
2.1 VROČINSKI STRES ... 20
2.2 OBPORODNO OBDOBJE IN PRESNOVNO DOGAJANJE ... 21
2.3 OKSIDATIVNI STRES ... 22
2.4 METABOLNI STRES IN NEGATIVNA ENERGIJSKA BILANCA ... 23
2.5 ANTIOKSIDANTI IN ANTIOKSIDATIVNA ZAŠČITA ... 27
2.5.1 Vitamin E ... 28
2.5.2 Selen ... 30
2.5.3 Glutation peroksidaza (GPX) ... 32
2.5.4 Superoksid dismutaza (SOD) ... 33
2.5.5 Skupni oz. totalni antioksidantni status (TAS) ... 35
2.6 ANALIZA PLODNOSTI IN PLODNOSTNE MOTNJE ... 35
2.6.1 Pojatveni ciklus in odkrivanje pojatev ... 36
2.6.2 Pregled plodnostnih parametrov ... 38
2.6.2.1 Doba med telitvama (DMT) ... 38
2.6.2.2 Servisni interval (SI) ... 38
2.6.2.3 Servisna perioda (SP) ... 39
2.6.2.4 Poporodni premor (PP) ... 39
2.6.2.5 Indeks uspešnosti osemenitve (IOU) ... 40
2.6.3 Plodnostne motnje ter spremljanje patoloških dogajanj na rodilih in jajčnikih ... 40
2.6.3.1 Vnetje maternice ... 40

2.6.3.2 Zaostala posteljica (retencija sekundin – RS) ... 41
2.6.3.3 Izostanek pojatvenega ciklusa v poporodnem obdobju ... 42
2.6.3.4 Cistično obolenje jajčnikov (Cystic Ovarian Disease - COD) ... 45
2.6.3.5 Involucija maternice in motnje v involuciji maternice ... 48
2.7 FOLIKULARNA TEKOČINA ... 49
2.8 EMBRIOTRANSFER OZ. PRENOS ZARODKOV ... 51
3 MATERIAL IN METODE ... 52
3.1 ZASNOVA RAZISKAVE IN POGOJI ... 52
3.2 REJA ŽIVALI ... 52
3.3 IZBIRA ŽIVALI – VKLJUČITVENI IN IZKLJUČITVENI KRITERIJI ... 53
3.3.1 Krave v tretji laktaciji ... 53
3.3.2 Telice prejemnice zarodkov ... 53
3.4 POGOJI ... 53
3.5 TRETIRANJE ŽIVALI ... 55
3.5.1 Krave ... 55
3.5.2 Telice prejemnice zarodkov ... 56
3.6 ODVZEM IN PRIPRAVA VZORCEV KRVI IN FOLIKULARNE TEKOČINE ... 57
3.6.1 Krave ... 57
3.6.2 Telice prejemnice zarodkov ... 58
3.7 SPREMLJANJE SPREMEMB NA RODILIH V POPORODNEM OBDOBJU ... 58
3.8 LABORATORIJSKE PREISKAVE ... 59
3.8.1 Določanja koncentracije selena in vitamina E ... 59
3.8.2 Določanje skupne antioksidantne kapacitete z reagenčnim kompletom TAS (TAC) ... 60
3.8.3 Določanje aktivnosti glutation peroksidaze – GPX ... 61
3.8.4 Določanje aktivnosti superoksid dismutaze – SOD ... 61
3.9 STATISTIČNE ANALIZE ... 62
4 REZULTATI ... 63
4.1 KONCENTRACIJA VIT. E IN Se TER VREDNOSTI PARAMETROV OKSIDATIVNEGA IN METABOLNEGA STRESA ... 63
4.2 ANALIZA PLODNOSTI ... 68
4.3 SPREMLJANJE PATOLOŠKIH DOGAJANJ NA RODILIH IN JAJČNIKIH ... 69
4.4 ODNOS MED PARAMETRI OKSIDATIVNEGA STRESA V FF IN KRVNI

PLAZMI ... 74
4.5 PRENOS ZARODKA ... 75
5 RAZPRAVA ... 78
5.1 STATUS VITAMINA E IN SELENA ... 79
5.1.1 Vitamin E ... 79
5.1.2 Selen ... 80
5.2 ANTIOKSIDANTNI STATUS ... 82
5.2.1 TAS ... 82
5.2.2 SOD ... 83
5.2.3 GPX ... 84
5.3 METABOLNI STRES ... 86
5.4 ANALIZA PLODNOSTI ... 88
5.5 PLODNOSTNE MOTNJE ... 89
5.5.1 Vnetje maternice ... 90
5.5.2 Zaostala posteljica ... 91
5.5.3 Tiha pojatev (subestrus) ... 92
5.5.4 Cistično obolenje jajčnikov ... 93
5.5.5 Motnje v involuciji maternice ... 94
5.6 ODNOS MED PARAMETRI FF IN KRVNE PLAZME ... 95
5.7 PRENOS ZARODKA ... 97
6 SKLEPI ... 100
7 POVZETEK ... 101
8 SUMMARY ... 105
9 ZAHVALE ... 109
10 LITERATURA ... 110
11 PRILOGE ... 125

KAZALO SLIK

Slika 1: Zdravila, uporabljena v raziskavi.
Figure 1: The drug used in the present study. 56

Slika 2: Transvaginalna ultrazvočna punkcijska sonda in punkcijska črpalka.
Figure 2: Transvaginal ultrasound puncture probe and puncture pump. 57

Slika 3: Prikaz postopka zamrzovanja.
Figure 3: Demonstration of the freezing process. 58

Slika 4: Ultrazvočni aparat Aloka, model SSD 550 s 5 MHz linearno transrektalno sondo.
Figure 4: Ultrasound device Aloka, model SSD 550 with a 5 MHz linear transrectal probe. 59

Slika 5: HPLC – Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti s fluorescenčnim detektorjem.
Figure 5: HPLC – High-performance liquid chromatography with a fluorescence detector. . 60

Slika 6: Masni spektrometer (Varian 820-MS).
Figure 6: Mass spectrometer (Varian 820-MS). 60

Slika 7: RX Daytona (RANDOX, VB) avtomatski biokemijski analizator.
Figure 7: RX Daytona (RANDOX, UK) automatic biochemistry analyzer. 62

Slika 8: Prikaz koncentracije vit. E v krvni plazmi v odvisnosti od časa pred oz. po porodu za tretirano in kontrolno skupino krav.
Figure 8: Display of the concentration of vit. E in blood plasma as a function of time before and after parturition for the treated and control group of cows. 65

Slika 9: Prikaz koncentracije Se v krvni plazmi v odvisnosti od časa pred oz. po porodu za tretirano in kontrolno skupino krav.
Figure 9: Display of the concentration of Se in blood plasma as a function of time before and after parturition for the treated and control group of cows. 65

Slika 10: Prikaz vrednosti TAS v krvni plazmi v odvisnosti od časa pred oz. po porodu za tretirano in kontrolno skupino krav.
Figure 10: Display of the TAS value in blood plasma depending on the time before and after parturition for the treated and control group of cows. 66

Slika 11: Prikaz vrednosti SOD v krvni plazmi v odvisnosti od časa pred oz. po porodu za tretirano in kontrolno skupino krav.
Figure 11: Display of SOD value in blood plasma depending on the time before and after parturition for the treated and control group of cows. 66

Slika 12: Prikaz vrednosti GPX v krvni plazmi v odvisnosti od časa pred oz. po porodu za tretirano in kontrolno skupino krav.
Figure 12: Display of GPX value in blood plasma depending on the time before and after parturition for the treated and control group of cows. 67

Slika 13: Prikaz koncentracije NEFA v krvni plazmi v odvisnosti od časa pred oz. po porodu za tretirano in kontrolno skupino krav.
Figure 13: Display of NEFA concentration in blood plasma depending on the time before and after parturition for the treated and control group of cows. 67

Slika 14: Prikaz koncentracije BHB v krvni plazmi v odvisnosti od časa pred oz. po porodu za tretirano in kontrolno skupino krav.
Figure 14: Display of BHB concentration in blood plasma depending on the time before and after parturition for the treated and control group of cows. 68

KAZALO TABEL

Tabela 1: Minimalne, maksimalne in povprečne vrednosti temperature zraka, relativne vlažnosti in ogljikovega dioksida v času izvajanja raziskave.
Table 1: Minimum, maximum and average values of air temperature, relative humidity and carbon dioxide during the research period. 54

Tabela 2: Sestava obroka.
Table 2: Composition of the meal. 54

Tabela 3: Vsebnost hranljivih snovi v obroku.
Table 3: Nutrient content of the diet. 55

Tabela 4: Primerjava vrednosti indikatorjev negativne energijske bilance (NEFA in BHB), vrednosti parametrov oksidativnega stresa (SOD, GPX, TAS) ter koncentracije vit. E in Se v krvni plazmi med kontrolno in tretirano skupino krav ter statistična pomembnost razlike pred začetkom tretiranja in po tretjem tretiranju.
Table 4: Comparison of values of indicators of negative energy balance (NEFA and BHB), values of oxidative stress parameters (SOD, GPX, TAS) and concentration of vit. E and Se in the blood plasma between the control and treated groups of cows and the statistical significance of the difference before the start of the treatment and after the third treatment. . 64

Tabela 5: Primerjava vrednosti plodnostnih parametrov med kontrolno in tretirano skupino.
Table 5: Comparison of values of fertility parameters between control and treated group. ... 69

Tabela 6: Primerjava incidence reprodukcijskih motenj (RM) v tretirani in kontrolni skupini molznic po porodu.
Table 6: Comparison of the incidence of reproductive disorders (RM) in treated and control group of dairy cows after parturition. 70

Tabela 7: Prikaz števila RM pri posamezni kravi iz kontrolne in tretirane skupine.
Table 7: Display of the number of RM in each cow from the control and treated group. 70

Tabela 8: Primerjava koncentracije vit. E in Se ter vrednosti parametrov oksidativnega in metabolnega stresa med skupino molznic z eno ali več RM in skupino molznic brez motenj 14 in 28 dni po porodu.
Table 8: Comparison of the concentration of vit. E and Se and values of oxidative and

metabolic stress parameters between a group of dairy cows with one or more RM and a group of dairy cows without disorders 14 and 28 days after parturition. 71

Tabela 9: Primerjava časa, potrebnega za involucijo maternice.
Table 9: Comparison of time required for uterine involution. 72

Tabela 10: Korelacijski koeficienti (r) statistične povezanosti med vrednostmi TAS, vit. E., Se, NEFA, BHB, SOD in GPX ob tretjem in četrtem vzorčenju ter incidenco posamezne reprodukcijske motnje in parametri plodnosti (N=34).
Table 10: Correlation coefficients (r) of statistical association between TAS values, vit. E., Se, NEFA, BHB, SOD and GPX at the third and fourth sampling and the incidence of individual reproductive disorders and fertility parameters (N=34). 73

Tabela 11: Korelacijski koeficienti statistične povezanosti (r) med vrednostmi TAS, vit. E, Se, NEFA, BHB, SOD in GPX v krvni plazmi ter vrednostmi TAS, Vit. E in Se v folikularni tekočini (N=34) 28 dni po porodu.
Table 11: Correlation coefficients of statistical association (r) between values of TAS, vit. E, Se, NEFA, BHB, SOD and GPX in blood plasma and TAS, Vit. E and Se in follicular fluid (N=34) 28 days postpartum. 75

Tabela 12: Primerjava vrednosti parametrov vit. E, Se, TAS in NEFA med kontrolno in tretirano skupino telic ter število uspešnih oploditev telic v posamezni skupini.
Table 12: Comparison of values of parameters vit. E, Se, TAS and NEFA between control and treated heifer groups and the number of successful insemination of heifers in each group. 76

Tabela 13: Primerjava vrednosti parametrov vit. E, Se, TAS in NEFA med uspešno in neuspešno oplojeno skupino telic.
Table 13: Comparison of values of Parameters vit. E, Se, TAS and NEFA between successfully and unsuccessfully inseminated heifers. 77

Tabela 14: Korelacijski koeficienti statistične povezanosti (r) med vrednostmi vit. E, Se, TAS in NEFA v krvni plazmi elic (N=34).
Table 14: Correlation coefficients of statistical association (r) between the values of vit. E, Se, TAS and NEFA in blood plasma of heifers (N=34). 77

Tabela 15: Preliminarna analiza parametrov plodnosti za petletno obdobje, ločeno za zimo in poletje.
Table 15: Preliminary analysis of fecundity parameters for a five-year period, separately for winter and summer. 125

Tabela 16: Preliminarna analiza pojavljanja reprodukcijskih motenj za petletno obdobje, ločeno za zimo in poletje.
Table 16: Preliminary analysis of the occurrence of reproductive disorders for a five-year period, separately for winter and summer. 127

Tabela 17: Dnevne izmerjene vrednosti temperature zraka, relativne vlažnosti in ogljikovega dioksida v času izvajanja raziskave.
Table 17: Daily measured values of air temperature, relative humidity and carbon dioxide during the research. 128

SEZNAM OKRAJŠAV

BHB – beta-hidroksibutirat

CL – rumeno telo

COD – Cistično obolenje jajčnikov (angl. Cystic Ovarian Disease)

DB – doba brejosti

DMT – doba med telitvami

EM – endometritis

ET – embriotransfer

FF – folikularna tekočina (angl. Follicular fluid)

FSH – folikel stimulirajoči hormon

GnRH – gonadotropin sproščujoči hormon

GPX – glutation peroksidaza

IUO – indeks uspešnosti osemenitve

LH – luteinizirajoči hormon

N – numerus

NDČ – načrtovana doba čakanja

NEB – negativna energijska bilanca

NEFA – neesterificirane maščobne kisline

PGF2a – prostaglandin

PP – poporodni premor

RM – reprodukcijska motnja

ROS – reaktivne kisikove zvrsti (angl. Reactive Oxygen Species)

RS – zaostala posteljica ali retencija sekundin

Se – selen

SI – servisni interval

SOD – superoksid dismutaza

SP – servisna perioda

SS – suha snov

TAS – skupna antioksidativna kapaciteta (angl. Total Antioxidant Capacity)

TVI – temperaturno-vlažnostni indeks

UZ - ultrasonografija ali pregled rodil z ultrazvokom

Vit. E – vitamin E

Zn – cink

1 UVOD

Obporodno obdobje, ki ga zaznamujejo velike presnovne zahteve po porodu ter visoka proizvodnja mleka, je pri molznicah pomembna faza predvsem z vidika fizioloških sprememb, ki se dogajajo in povzročijo merljive spremembe v diagnostičnih parametrih krvi in folikularne tekočine (FF). Nastopi oksidativni stres, ki je posledica vseh obremenjujočih dogajanj v organizmu; poslabša se presnovni status s povečano potrebo po energiji, kar oslabi imunski odziv, zato so krave v tem obdobju bolj nagnjene k nastanku oz. napredovanju številnih bolezni. Če obporodno obdobje (cca. od 21 dni pred in 21 po porodu) pri molznici nastopi v vročih poletnih mesecih, ima vročinski stres še dodaten negativen učinek na oksidativni in presnovni status molznic ter posledično na reprodukcijske parametre in na splošno zdravje. Poznavanje vplivov oksidativnega, vročinskega in metabolnega stresa na procese v telesu, sploh v obdobju pred in po telitvi, je pomembno tako za zagotavljanje zdravja živali kot tudi iz gospodarskega vidika, saj so od teh vplivov v veliki meri odvisne tudi reprodukcijske značilnosti. Visoka temperatura, oksidativni stres in negativna energijska bilanca (NEB) imajo negativen učinek na parametre plodnosti in so povezane z reprodukcijskimi boleznimi, zato je raziskovanje in boljše poznavanje teh učinkov osnova za uvajanje tehnik in metod preprečevanja ter zdravljenja.

Motnje v reprodukciji predstavljajo na kmetijah veliko težavo, zato so toliko bolj pomembne raziskave, ki se ukvarjajo z dejavniki uspešnosti reprodukcije, saj je poznavanje vplivov nujno za razvoj tehnologij preprečevanja in zdravljenja. Kot pri vseh ostalih motnjah in boleznih, tudi pri reprodukcijskih motnjah, stremimo k preventivi. Ključen vzrok za slabšo plodnost vseh gospodarsko pomembnejših domačih živali v poletnih mesecih je pregrevanje živali in vročinski stres. Posledica tega je veliko neuspešnih osemenitev; pojatev traja krajši čas in je manj intenzivna; slabša je sposobnost oploditve; več je zgodnjega odmiranja zarodkov; zaradi prezgodnjih telitev se rojevajo šibka teleta; v primerjavi z ostalimi deli leta pride večkrat do pojava zaostajanja posteljice (retencija sekundin) (Ratiznojnik, 2018).

Molznice v obporodnem obdobju porabijo več kisika; povečana je presnovna potreba, da zagotovijo energijo, potrebno za začetek laktacije. To povečanje presnovne aktivnosti povzroči povečano kopičenje ROS in izčrpavanje pomembne antioksidativne obrambe v času telitve (Sordillo, 2005). Prekomerna proizvodnja prostih radikalov skupaj s poškodbami na celični ravni oslabi celične antioksidantne obrambne sisteme, vključujoč antioksidativne encimske sisteme (npr. superoksid dismutaza – SOD, glutation peroksidaza – GPX in katalaza) ter neencimske sisteme (npr. vit. E in Se). Oksidativni stres je mogoče spremljati z več biomarkerji.

Pomembne spremembe pokazateljev oksidativnega stresa (SOD, GPX, vit. E, Se, skupni antioksidativni status – TAS) potrjujejo, da se v pozni brejosti, med telitvijo in začetkom laktacije pri kravah molznicah pojavi oksidativni stres. Prehodno obdobje med pozno brejostjo in začetkom laktacije zahteva tudi hitro presnovno prilagoditev molznic. Rast ploda, telitev in začetek laktacije povzročajo povečanje potreb po energiji, zato so krave v tem obdobju nagnjene k NEB, ko potrebe po energiji presegajo prehranski vnos. V primerih, ko potrebe po energiji niso izpolnjene s prehrano ali dodatki, molznice kot vir energije izkoriščajo lastne maščobne zaloge: to so neesterificirane maščobne kisline (NEFA), glavna sestavina trigliceridov (maščob) v telesu. Prekomerna presnova NEFA lahko povzroči kopičenje maščob v jetrih, posledično zamaščena jetra in ketozo. Zato se metabolni oz. presnovni profili uporabljajo za spremljanje zdravstvenega, reprodukcijskega in prehranskega stanja goveda.

1.1 NAMEN DELA

V poletnih mesecih veterinarji na terenu opažamo slabšo plodnost ter višjo pojavnost različnih reprodukcijskih motenj (RM) in bolezni pri kravah. Da bi svoja opažanja lahko tudi empirično potrdili, smo za čredo krav molznic v namen pričujoče raziskave naredili preliminarno analizo parametrov plodnosti (tabela 15) ter incidenco RM za petletno obdobje (tabela 16). Primerjali smo parametre plodnosti in število RM pri kravah, ki so telile v dveh zimskih mesecih (januar in februar) s parametri in številom RM pri kravah, ki so telile v dveh poletnih mesecih (julij, avgust) za obdobje od leta 2012 do vključno 2016.

Analiza je bila opravljena na čredi krav molznic (170 krav v proizvodni čredi) na zasebni kmetiji. Povprečni indeks uspešnosti osemenitve (IUO) za petletno obdobje zimskih mesecev je znašal 1,70; prva osemenitev je bila uspešna v 57 %; povprečna dolžina servisnega intervala je bila 46 dni in povprečna doba med telitvami 352 dni. Medtem ko je poletni IUO znašal 1,88, je bila prva osemenitev uspešna v 49 %; povprečna dolžina servisnega intervala je bila 54 dni in povprečna doba med telitvami 362 dni. Tudi pojavnost RM po porodu je bila za pet do deset odstotkov višja v poletnih mesecih; analiza je pokazala različne vrednosti pojavljanja glede na posamezno RM (zaostala posteljica, ovarialne ciste, endometritis, ciste na jajčnikih). Vročinski stres je zagotovo eden izmed pomembnih dejavnikov slabše plodnosti in večjega števila RM v poletnih mesecih, zato smo želeli v pričujoči raziskavi preveriti, ali lahko s preventivnim dodajanjem antioksidantov ter mikro- in makroelementov omilimo posledice vročinskega stresa. Preventivno dodajanje Se in vit. E se je že izkazalo za uspešno pri zmanjševanju različnih

zdravstvenih težav goveda in zmanjševanju deleža reprodukcijskih težav v čredi, predvsem v poletnih mesecih, ko vročinski stres še dodatno oslabi delovanje imunskega sistema goveda (Brzezinska-Slebodzinska in sod., 1994; Allison in Laven, 2000; Smith in sod., 1984; Weiss in sod., 1997).

V prvem delu naše raziskave smo želeli preveriti, ali bo imelo zdravljenje molznic v obporodnem obdobju z vitamini AD$_3$E oz. kombinacijo vit. E in Se pozitivne učinke na zmanjševanje metabolnega, oksidativnega in vročinskega stresa ter njegovih posledic na zdravje in reprodukcijske parametre. Določili smo koncentracijo vit. E in Se, aktivnosti SOD in GPX ter vrednosti TAS, NEFA in BHB v krvni plazmi pri zdravljeni skupini molznic in kontrolni skupini v štirih zaporednih merjenjih v razponu od enega tedna pred porodom do štirih tednov po porodu.

V drugem delu raziskave smo želeli preveriti, ali se preventivno dodajanje vit. E in Se povezuje tudi z uspešnostjo embriotransferja (ET) pri telicah, in sicer smo ugotavljali razlike v implantacijski sposobnosti med telicami, ki smo jih tretirali s Se in kombinacijo vitaminov AD$_3$E in netretiranimi telicami. Ob ET smo obema skupinama vzeli vzorce krvi in določali koncentracijo vit. E, Se in NEFA ter vrednost TAS v krvni plazmi.

Rezultati študije bodo pripomogli k boljšemu razumevanju povezave nastanka plodnostnih motenj, ki so posledica medsebojnega delovanja metabolnega, vročinskega in oksidativnega stresa. Rezultati raziskave dajejo vpogled v smiselnost uvajanja preventivnega kliničnega pristopa, in sicer z uporabo sredstev za njihovo preprečevanje.

Namen raziskave je bil določiti antioksidativni in metabolni status pri kravah molznicah v obporodnem obdobju, ugotoviti, ali obstaja povezava med ROS v folikularni tekočini (FF) in krvni plazmi ter ali je podporna terapija s Se in kombinacijo vitaminov AD$_3$E pri kravah pred porodom smiselna za zmanjševanje negativnih učinkov oksidativnega in metabolnega stresa ter ali je pozitivno povezana z zmanjšano incidenco reprodukcijskih motenj ter izboljšanjem parametrov plodnosti. Pri telicah prejemnicah smo s tretiranjem pred transferjem zarodkov želeli ugotoviti, ali obstaja razlika v uspešnosti ET.

1.2 HIPOTEZE

H1: *V puerperiju visokoproduktivnih krav prihaja do velikega oksidativnega stresa, ki je posledica metabolnega in ima nadaljnje negativne posledice na reprodukcijske značilnosti krav. Nanj lahko vplivamo s tretiranjem z antioksidanti.*

Znano je, da obstaja povezava med oksidativnim stresom, ki ga povzročijo visoke zunanje temperature in negativna energijska bilanca, ter oksidativnim statusom krvne plazme. Določali bomo koncentracije metabolitov NEFA in BHB, ki sta kazalnika energijske bilance, ter ju primerjali z ROS v krvni plazmi in FF. Ugotavljali bomo, ali so kakšne razlike v koncentraciji ROS med kravami glede na njihov energijski status. Če bo prišlo do razlik oksidativnega statusa in razlik v pojavu reprodukcijskih motenj med tretiranimi in netretiranimi kravami, bo to kazalo na potencialen vpliv dodanih antioksidantov in verjetnost vpliva ROS na reprodukcijske motnje, ki so posledica negativne energijske bilance.

H2: *Obstaja povezava med koncentracijo ROS v folikularni tekočini (FF) in krvni plazmi.*
Znano je, da je FF v foliklu ločena od perifolikularnega tkiva s folikularno steno, ki predstavlja krvno-folikularno bariero. To tekočino sestavljajo produkti lokalno proizvedenih snovi folikla, ki so povezane z metabolno aktivnostjo folikularnih celic, in deloma tudi eksudat krvne plazme. Z merjenjem koncentracije ROS, Se in vit. E v krvni plazmi in FF bomo ugotovili, ali obstaja povezava med njima in kakšne so morebitne razlike. Če obstaja razlika v koncentraciji ROS v krvni plazmi in FF, bo to kazalo na verjetne lokalno kompenzirajoče mehanizme.

H3: *Preventivno dajanje antioksidantov − kombinacije Se in vitaminov AD$_3$E − je smiselno za zmanjševanje oksidativnega stresa in pripomore k izboljšanju reprodukcijskih značilnosti krav.*

Se in vit. E sta najpogosteje uporabljena antioksidanta. V praksi se uporabljata kot tokoselen in kombinacija vitaminov AD$_3$E. Ugotavljali bomo, ali so kakšne razlike v obporodnem dogajanju pri kravah, ki bodo tretirane pred porodom, in netretirano kontrolno skupino. Ultrazvočno bomo spremljali involucijo maternice in spremembe na jajčnikih. Naredili bomo analizo plodnosti in jo primerjali z oksidativnim statusom posamezne krave. Analiza bo vključevala obdobje od telitve do prve osemenitve (servisni interval - SI), obdobje od prve do uspešne osemenitve (servisna perioda - SP) pri kravah, ki po prvi osemenitvi niso ostale breje, poporodni premor (PP) in dobo med telitvami (DMT). Poleg teh bomo spremljali še patološka dogajanja na rodilih in jajčnikih: zaostala posteljica (retencija sekundin - RS), motnje v involuciji maternice, endometritis (brez retencije sekundin - EM), tihe pojatve (subestrus) in izostajanje pojatev

(anestrus). Po štirih tednih po porodu bomo ultrazvočno punktirali FF in primerjali koncentracije ROS, Se in vit. E s koncentracijami v krvni plazmi med tretiranimi in netretiranimi kravami. Nadalje bomo spremljali ostale parametre raziskave.

H4: *Dajanje Se in kombinacije vitaminov AD3E vpliva na oksidativni status oz. stres visokoproduktivnih krav molznic, ki ga povzročajo visoke zunanje temperature.*

Znano je, da vročinski stres vpliva na koncentracije ROS krvi. Ugotavljali bomo, kakšne so njegove koncentracije pri tretirani in netretirani skupini krav glede na temperaturo v hlevu. Če bo prišlo do razlik v oksidativnem statusu in razlik v pojavu reprodukcijskih motenj med tretiranimi in netretiranimi kravami, bo to kazalo na verjetnost vplivov dodanih antioksidantov in verjetnost vpliva ROS na reprodukcijske motnje.

H5: *Preventivno dajanje antioksidantov (Se, vit. AD3E) je učinkovito in smiselno za zmanjševanje oksidativnega stresa in doseganje večje implantacijske sposobnosti zarodkov*.

Ugotavljali bomo razlike v implantacijski sposobnosti med telicami, ki jih bomo tretirali s Se in vitamini AD3E, in netretiranimi telicami. Ob transferju zarodka bomo obema skupinama odvzeli vzorec krvi in analizirali ROS v krvni plazmi. Če obstaja razlika med skupinama, jo lahko pripišemo vplivu dodanih antioksidantov.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 VROČINSKI STRES

Poletna visoka okoljska temperatura in visoka zračna vlaga sta dejavnika, ki povzročita, da pride pri govedu do pojava vročinskega stresa (Betteridge, 2000; Paula-Lopes in sod., 2012). Telesna temperatura naraste in živali poskušajo učinke neugodnega okolja blažiti s povečanim znojenjem in pospešenim dihanjem. Ker živali ne morejo sproti odvajati odvečne toplote, pride do vročinskega stresa, v katerem organizem živali ne more vzdrževati ravnovesja med tvorbo toplote in njenim oddajanjem v okolje, kar zaviralno vpliva na produkcijsko sposobnost in zdravje krav. Še posebej so prizadete krave z večjo mlečnostjo in tiste na višku laktacije – te so najbolj presnovno obremenjene zaradi velike proizvodnje (Badinga in sod., 1993).

Kdaj pride do vročinskega stresa, je odvisno predvsem od temperature okolja in od vlažnosti zraka. Pri visoki vlažnosti se lahko vročinski stres pojavi že pri temperaturah nad 20 ºC, temperatura 25 ºC pa je pogosto omenjena kot tista kritična, nad katero je potrebno začeti izvajati ukrepe za blaženje ali preprečevanje vročinskega stresa. Zaradi segrevanja telesa in nezmožnosti oddajanja toplote se telesna temperatura poviša; sledijo fiziološki odzivi organizma z zmanjšanjem proizvodnje in številnimi težavami (krava zaužije manj krme, poslabša se resorpcija hranilnih snovi, zmanjšano izločanje hormonov – hormonsko neravnovesje) (Ratiznojnik, 2018).

Malo je študij, ki bi preučevale neposredni vpliv vročinskega stresa na oksidativni status pri govedu. Harmon in sod. (1997) so poročali o zmanjšanju antioksidativne aktivnosti plazme v obdobju srednje laktacije pri kravah, podvrženim vročinskemu stresu. Trout in sod. (1998) niso uspeli dokazati učinkov vročinskega stresa na plazemske koncentracije vit. E in β-karotena ali na mišično vsebnost ROS. Calamari in sod. (1999) poročajo o šibkih negativnih učinkih vročinskega stresa na nekatere plazemske indikatorje oksidativnega statusa pri kravah v srednji laktaciji. Bernabucci in sod. (2005) so dokazali višje vrednosti oz. koncentracije plazemskih antioksidativnih encimskih sistemov (SOD in GPX) pri kravah v prehodnem obdobju, ki so bile izpostavljene zmernemu vročinskemu stresu (39,5 ± 0,2 °C rektalne temperature) zaradi poletnega temperaturno-vlažnega indeksa (TVI) (73,2 ± 2,5 povprečnega dnevnega TVI) v primerjavi s kravami, ki so telile spomladi, kar kaže na stanje oksidativnega stresa pri kravah molznicah zaradi poletnega prehoda. Več je podatkov o hormonskih in reprodukcijskih motnjah, ki jih pripisujejo posledicam vročinskega stresa. Hormonske motnje zmanjšujejo

količino mleka in so predvsem vzrok za reprodukcijske težave. Vročinski stres slabo vpliva na razvoj foliklov v jajčnikih; omejuje njihovo rast in razvoj. Nastajajo folikli, ki so manjši, slabše kakovosti in izločajo manjše količine estradiola. Zaradi nizke količine estradiola je trajanje pojatvenega ciklusa in pojatve daljše. Motena je tudi ovulacija (Armstrong in sod., 2003). Lahko se zgodi, da ovulacije sploh ni in na jajčnikih ostanejo ciste ali pa ovulacija zapozni, zato se poslabša uspešnost osemenitve (Ratiznojnik 2012; De Rensis in Scaramuzzi, 2003). Vročinski stres vpliva tudi na rumeno telo (CL) na jajčniku, ki tvori progesteron, hormon brejosti, ki je nujno potreben za vzdrževanje brejosti. Če koncentracija tega hormona upade, se zarodek ne more obdržati v maternici ter razvijati, zato odmre (abortus). Če traja vročinski stres dlje časa, je upad progesterona v krvi celo 25-odstoten (De Rensis in Scaramuzzi, 2003). Zaradi stresa ob pregretju organizma je povečana tudi koncentracija kortizola, stresnega hormona nadledvične žleze, ki zavira ugnezditev zarodka v maternično steno in povzroča zgodnjo embrionalno smrtnost (Ealy in sod., 1993). Ovulirano jajčece iz slabšega folikla tudi samo kaže znake slabše kakovosti. Tako ima jajčece manjšo sposobnost oploditve. Četudi se oplodi, zarodek pogosteje kmalu odmre. Vročinski stres neposredno vpliva tudi na zarodke. Veliko zarodkov propade kmalu po oploditvi, ko imajo komaj dve oziroma štiri celice. Prvih nekaj dni po oploditvi so zarodki veliko bolj občutljivi na vročinski stres kot v poznejšem obdobju, ko se že razvije njihova lastna sposobnost prilagajanja (De Rensis in Scaramuzzi, 2003; Ealy in sod., 1993; Ratiznojnik, 2018).

2.2 OBPORODNO OBDOBJE IN PRESNOVNO DOGAJANJE

Obporodno obdobje (t. j. tri tedne pred porodom in tri tedne po porodu), ko krave molznice preidejo iz pozne brejosti v začetek laktacije, je zelo pomembna faza, saj je žival pod velikim stresom. Stres škoduje imunskemu odzivu in lahko povzroči, da so tako odrasle kot mlade živali manj odporne na bolezni. Krava molznica je v tem obdobju veliko bolj dovzetna za okužbe in klinične bolezni (mastitis in metritis) kot v obdobju pozne laktacije in presušitve. Stres v tem obdobju je posledica poroda, začetka laktacije, negativnega energijskega statusa, porušenega ravnotežja med konzumacijo in porabo beljakovin in kalcija ter povečane ravni steroidnih hormonov, zato so molznice v prehodnem obdobju še posebej dovzetne za zdravstvene težave in motnje (Bernabucci in sod., 2005; Castillo in sod., 2005; Sordillo in Aitken, 2009). V obporodnem obdobju so krave molznice še posebej dovzetne za reprodukcijke težave, ker prosti radikali motijo embrionalni razvoj in sintezo steroidov (Sordillo in Aitken, 2009).

Bolezni v tej fazi ne vplivajo le na dobro počutje živali, ampak povzročajo tudi velik negativni gospodarski učinek na mlečnih farmah, saj poleg stroškov zdravljenja, prizadete krave ne bodo dosegle svoje najvišje prireje mleka. Prekomerna proizvodnja ROS vodi do oksidativnega stresa, ki je bil opredeljen kot osnovni dejavnik disfunkcionalnih vnetnih odzivov. Dopolnjevanje z vitamini ter makro- in mikroelementi je učinkovit način za zmanjšanje škodljivih posledic prekomerne proizvodnje ROS ter izboljšanje zdravstvenega stanja živali. Kljub temu pa obstajajo tudi dokazi, da ima prekomerno uživanje dodatkov nekatere škodljive učinke, kot je povečana incidenca mastitisa (Bouwstra in sod., 2010), saj lahko presežek antioksidantov povzroči povečanje proizvodnje prooksidantov.

2.3 OKSIDATIVNI STRES

Kakor že omenjeno, ima vročinski stres učinek na reprodukcijske parametre, in sicer preko pojava oksidativnega stresa in NEB. Vročinski stres poruši ravnovesje med oksidanti in antioksidanti v organizmu kar vodi v oksidativni stres v celicah organizma, v neravnovesje med proizvajanjem prostih radikalov in zmožnostjo telesa, da nevtralizira ali razstrupi njihove škodljive posledice z nevtralizacijo s pomočjo antioksidantov (Betteridge, 2000). Prosti radikali oz. ROS so produkti normalne celične presnove in imajo pomembno fiziološko funkcijo v celici, kadar je vzpostavljeno ravnovesje med proizvodnjo in varnim odstranjevanjem ROS (Moradas-Ferreira in sod., 1996). ROS so visoko reaktivni prosti radikali, ki vsebujejo kisikove ione ali perokside. Nastanejo kot stranski produkt normalne presnove kisika in imajo pomembno vlogo pri celičnem signaliziranju; poleg tega jih levkociti izrabljajo kot obrambni mehanizem proti različnim mikrobom. Ob vročinskem stresu nivo teh spojin zelo naraste, kar povzroči obsežne poškodbe celičnih struktur; tovrstno stanje imenujemo oksidativni stres. Oksidativni stres vključuje vsa stanja, v katerih se koncentracija ROS poveča, vendar ne gre samo za delovanje ROS, saj se oksidativni stres pojavi tudi kot posledica izrabe antioksidantne zaščite, kar vodi v porušenje ravnovesja med ROS in antioksidantnim obrambnim mehanizmom v organizmu (Halliwell, 1994; Stohs, 1995; Droge, 2002). ROS delujejo znotraj celic in zunaj njih, spremembe pa vodijo v različne bolezni, povzročajo staranje in odmiranje celic; visoke koncentracije ROS vodijo v oksidativne poškodbe lipidov, beljakovin in DNA (Valko in sod., 2007). Pomanjkanje zaščitnih snovi (antioksidantov) v celici in prekomerna izpostavljenost dejavnikom, ki spodbujajo tvorbo ROS (med temi je visoka temperatura), vodi v poslabšanje delovanja in zdravja organizma (Sajal in sod. 2011; Patrick in sod., 2012). Raziskave so

pokazale, da ima oksidativni stres pomemben negativni vpliv na plodnost samic in zdravje gamet (Allison in Laven, 2000; Bernabucci in sod., 2005; Castillo in sod., 2005; Sordillo, 2005; Wilde, 2006), zato se lahko prehransko ali terapevtsko posredovanje izkaže kot učinkovita strategija za preventivo plodnostnih motenj.

Zaradi izredno kratke življenjske dobe radikalov je težko točno določiti stanje oksidativnega stresa in posledično določiti antioksidativni status v organizmu. Določitev oksidativnega stresa v organizmu je le približna ocena trenutnega stanja. ROS, ki nastajajo med različnimi oksidacijskimi procesi, so zelo raznolike in spremenljive, zato jih težko zaznamo (Osredkar, 2012). Stanje oksidativnega stresa v organizmu zato določamo posredno. Najpogostejša metoda določevanja ROS je določanje sekundarnih produktov oksidacije lipidov, proteinov in DNA, ki nam omogočajo posredno oceno oksidativnega statusa. Ena izmed možnosti je tudi določanje produktov, ki nastanejo ob interakciji ROS z makromolekulami. Lažje kot določanje oksidativnega statusa je oceniti antioksidativni status, saj lahko merimo aktivnosti posameznega antioksidanta ali kot skupni antioksidativni status. Antioksidativni status lahko določamo s pomočjo več parametrov; med njimi sta glutation peroksidaza (GPX), superoksid dismutaza (SOD) ali kot skupno vsoto vseh antioksidantnih snovi – skupni antioksidativni status (TAS). Sposobnost obrambe telesa pred ROS lahko merimo tudi s statusom posameznih antioksidantov, npr. status vit. E in Se.

2.4 METABOLNI STRES IN NEGATIVNA ENERGIJSKA BILANCA

Obporodno obdobje med pozno brejostjo in začetkom laktacije zahteva hitro presnovno prilagoditev molznic, saj rast ploda, telitev in začetek laktacije povzročijo povečane energijske potrebe telesa. Presnova krav molznic je še posebej obremenjena v poporodnem obdobju zaradi povečane laktacije. Zato je v tem obdobju toliko večja verjetnost, da pri živali nastopi stanje negativne energijske bilance oz. NEB, t. j. stanje, ko krave niso sposobne zaužiti dovolj energije oz. zadostno količino kvalitetne krme, da bi pokrile potrebe, ki nastanejo zaradi povečane proizvodnje mleka. Energijski status krave oz. energijska bilanca je torej definirana kot razlika neto vnosa energije in neto količine energije, potrebne za vzdrževanje in prirejo mleka (Mattos in sod., 2000). Ob premajhnem zaužitju energije za pokritje energijskih potreb živali kot vir energije uporabljajo telesne rezerve. Taka stanja zahtevajo kompenzatoren odgovor organizma, ki vključuje povečano lipolizo maščobnega tkiva, glukoneogenezo in glikogenolizo v jetrih, mobilizacijo beljakovin iz mišičnega tkiva ter mobilizacijo mineralov iz kosti (Duffield in sod.,

1999).

V stanju NEB pride do sprememb v koncentraciji različnih presnovkov v krvi. Zviša se koncentracija NEFA in BHB (Schillo, 1992; Vanholder in sod., 2005; Opsomer in sod., 1998; Leroy in sod. 2004), znižajo pa se koncentracije glukoze, holesterola, sečnine (Opsomer, 1999; LeBlanc, 2010b), inzulina in IGF-1 (LeBlanc, 2010b). BHB oz. beta-hidroksibutirat je kemijska spojina, ki nastane kot stranski produkti presnove maščobnih kislin in telesu zagotavlja energijo, ko ta ne dobi dovolj ogljikovih hidratov ali sladkorjev. Gre za ketonska telesa, katerih sinteza se poviša v času, ko v krvi primanjkuje glukoze in tkiva niso dovolj dobro preskrbljena z energijo. NEFA oz. neesterificirane maščobne kisline so molekule, ki se sproščajo iz trigliceridov z delovanjem encima lipaze in se po krvi prenašajo vezane na albumin. Prispevajo majhen delež telesne maščobe, vendar zagotavljajo velik del telesne energije. Koncentracije NEFA odražajo energijsko stanje živali, pri čemer visoke koncentracije kažejo na NEB. NEB in visoke koncentracije NEFA v serumu so dejavniki tveganja za presnovne bolezni pri kravah molznicah. Normalne vrednosti NEFA pri zdravih kravah zunaj obporodnega obdobja so med 0,2 in 0,3 mmol/l, medtem ko počasi naraščajo v tednu pred telitvijo in končno dosežejo vrednosti med 0,5 mmol/l in 2 mmol/l v drugem tednu po telitvi. Adewuyi in sod. (2005) navajajo, da so vrednosti NEFA po telitvi med 0,5 mmol/l in 0,7 mmol/l znak blage NEB; vrednosti, ki so večje od 0,7 mmol/l, kažejo na hudo NEB. Normalne vrednosti BHB v krvni plazmi so do 0,80 mmol/l; med 0,80 mmol/l in 1,00 mmol/l so znak blage NEB, nad to vrednostjo pa znak hude NEB (Ježek in sod., 2017).

Stanje NEB neposredno po porodu ima negativen vpliv na zdravstveno stanje in reprodukcijske sposobnosti živali (Lucy in sod., 1991; Leroy in sod., 2004). Največje spremembe v koncentraciji NEFA se dogajajo dva tedna po telitvi (LeBlanc, 2010b). Te spremembe vplivajo na delovanje jajčnikov in posledično na plodnost živali (Dirandeh in sod., 2013). Opsomer in sod. (1998) ugotavljajo, da ima skoraj 50 % krav mlečne pasme, ki so v stanju izrazite NEB, reprodukcijske motnje (zapoznela cikličnost, nezmožnost ovulacije, podaljšana lutealna faza), ki so povezane z ovarialno funkcijo v zgodnjem poporodnem obdobju. Čas vzpostavitve normalne ovarialne aktivnosti je močno odvisen od energijskega statusa živali; do prve ovulacije pride, ko se vzpostavi določeno ravnotežje med oskrbo in porabo z energijo (Dirandeh in sod., 2013; King in sod., 1976; Staples in sod., 1990). Vplivi stanja NEB na plodnost se kažejo kot zadrževanje rasti foliklov, izostanek ovulacije in pojatve (Dirandeh in sod., 2013), tihe pojatve, zakasnjena ovulacija, ciste, nefunkcionalni jajčniki (Lucy in sod., 1991; Leroy in

sod. 2004), zgodnja embrionalna smrtnost (Opsomer in sod., 1998). Povečane vsebnosti NEFA ob zmanjšani vsebnosti glukoze v FF upočasnijo zorenje jajčnih celic in kasneje razvoj zarodkov (Wheelock in sod., 2010; Schillo, 1992; Vanholder in sod, 2005); pojavljajo se ciste na jajčnikih; uspešnost prve osemenitve je slabša; poporodni premor se podaljša; slabši je indeks osemenitev (Jenko, 2012; Nigussie, 2018; Fenwick in sod., 2008).

Vročinski stres v poletnih mesecih še dodatno vpliva na poslabšanje energijske bilance zaradi slabše ješčnosti krav; raziskave kažejo, da se vnos suhe snovi zmanjša tudi za 30 % (Wheelock in sod., 2010). Učinek vročinskega stresa na plodnost je torej posreden preko energijske bilance, ki je eden od glavnih vzrokov, zaradi katerih pri kravah ne pride do ovulacije. V času vročinskega stresa zmanjšana konzumacija povzroči padec koncentracije luteinizirajočega hormona (LH) in zmanjša velikost dominantnega folikla. Negativni energijski bilanci sledi zmanjšanje koncentracije inzulina, glukoze in hormona IGF-1 ter povečanje koncentracije rastnega hormona in neesterskih maščobnih kislin v krvi. Inzulin pa je potreben za razvoj folikla in ima pozitiven učinek na kakovost oocite; IGF-1 in glukoza spodbujata rast folikla in ugnezditev zarodka (Jenko, 2012).

Z določanjem BHB in NEFA v krvi ocenimo stopnjo NEB, ki je pomemben dejavnik pri iskanju vzrokov za plodnostne motnje v zgodnjem poporodnem obdobju (Podpečan, 2005). Zaradi vseh učinkov na parametre plodnosti pri kravah z visoko mlečnostjo želimo zniževati oz. v čim večji meri preprečevati stanje NEB, vendar je to v praksi precej težko. Trenutne strategije se osredotočajo predvsem na ohranjanje optimalnega vnosa energije v obdobju pred porodom ter hitro povečanje vnosa po telitvi, kar se je izkazalo za učinkovito pri zmanjševanju NEB in škodljivih učinkov na delovanje jajčnikov in jeter (Santos in sod, 2008).

Neustrezen vnos hranil in nezadostne telesne zaloge v zgodnji laktaciji sta glavna dejavnika, ki vplivata na reprodukcijsko zmogljivost krav molznic. Prvi in najpomembnejši dejavnik, ki vpliva na vnos energije pri kravah molznicah, je razpoložljivost krme (Grant in Albright, 1995), zato bi morale imeti krave molznice pred porodom stalen dostop do visokokakovostne krme. Za povečanje vnosa energije v zgodnjem obdobju laktacije je, poleg krmljenja z visoko kakovostno krmo, potrebno povečati razmerja med koncentratom in krmo ali v prehrano dodajati dodatne maščobe. Prehrana, dopolnjena z maščobami, je nujna predvsem za povečanje koncentracije energije ter za povečanje proizvodnje mleka in uravnavanje ovarialne aktivnosti (King in sod., 1976; Santos in sod., 2008). Krmljenje z dodanimi nezaščitenimi maščobami

dvigne koncentracijo energije v obroku in tako potencialno zniža NEB (Staples in sod., 1990; van Knegsel in sod., 2007). Če je dodanih nezaščitenih maščob v obroku več kot 50–60 g/kg suhe snovi (SS), se lahko zmanjša ješčnost krav, kar pa poslabša stanje NEB (Schauff in Clark, 1992). Kravam po telitvi je potrebno ponuditi obroke, ki zagotavljajo dobro oskrbo z glukozo (propionat v vampu, nerazgradljiv škrob, glukoneogene aminokisline) in se hkrati izogibati pretiranim količinam beljakovin v obrokih. Presežek beljakovin spodbuja mlečnost in s tem povečanje NEB, kar ima negativen učinek na pojatveni ciklus (van Knegsel in sod., 2007). Vandehaar in sod. (1999) navajajo, da hranjenje s predporodno dieto z višjo vsebnostjo energije ter dodatkom vit. E in Se vodi do zmanjšanja koncentracije NEFA in BHB v krvi.

NEB ima pri kravah v puerperiju pomemben vpliv na ciklično aktivnost jajčnikov, v prvi vrsti na folikulogenezo in ovulacijo. Novejša literatura poudarja pomembnost NEB, ki z zaviranjem pulzatornega izločanja gonadotropin sproščujočega hormona (GnRH) in LH zavira ciklično aktivnost jajčnikov krav mlečnih pasem. Drugače povedano, od NEB je odvisno, kdaj po porodu se bo ta vrnila v pravilno ciklično aktivnost (Duffield in sod,1999). Število foliklov (premera 10–15 mm) se povečuje, če pride do izboljšanja NEB pred 25. dnevom po telitvi. Posledica NEB v začetku puerperija oz. laktacije se kaže v podaljšani anestriji pri 30 do 36 % krav. NEB se lahko začne že pred telitvijo, vendar je v prvih 3–4 tednih po porodu v močni korelaciji s časom do prve ovulacije. Stopnja kot tudi trajanje NEB znatno vpliva na obdobje do prve ovulacije (Tomašković in sod., 2009). V 10 do 25 dneh po telitvi ne pride do prve ovulacije, dokler NEB ne doseže najnižje (minimalne) stopnje. Kljub temu je mogoče, da je energijski status krav v puerperiju bolj odvisen od vnosa kalorij kot od proizvodnje mleka. Z izboljšanjem energijskega statusa, z vnosom suhe snovi, s skrbjo za optimalno uravnotežen obrok v prehodnem obdobju in začetku laktacije se skrajšuje obdobje do prve ovulacije. S ciljem, da zadovoljimo velike potrebe po energiji, moramo povečati vnos suhe snovi po porodu za 4 do 6-krat. Na žalost v puerperiju ni mogoče povečati vnosa suhih snovi tako hitro, kot rastejo energijske potrebe v laktaciji (Duffield in sod., 2003).

Zamujanje povratka ciklične aktivnosti jajčnikov je povezano s stopnjo NEB. Krave z bolj izrazito NEB imajo v krvi višjo vsebnost nenasičenih maščobnih kislin in triacilgliceridov, ki podaljšajo obdobje do prve ovulacije. Zato je v zgodnjem puerperiju visokoproduktivnih krav za vrnitev ciklične aktivnosti jajčnikov, razvoja rumenega telesa ter sinteze progesterona, nujen visok vnos suhe snovi (Tomašković in sod., 2009). Poleg materinstva, sproščanja prolaktina in prostaglandinov, učinkuje negativno na izločanje gonadotropinov in posredno na aktivnost

jajčnikov zlasti negativna energijska bilanca (Žust in sod., 2009).

2.5 ANTIOKSIDANTI IN ANTIOKSIDATIVNA ZAŠČITA

Človeški in živalski organizem imata več celičnih mehanizmov, ki uravnavajo nivo ROS in tako preprečujejo njihove negativne učinke na celice. Antioksidantni obrambni sistem, ki organizem oziroma celice ščiti pred negativnimi učinki ROS, se je razvil v evoluciji kot odgovor na povečano koncentracijo kisika v atmosferi (Gutteridge, 1994). Za obrambo pred prostimi radikali telo potrebuje antioksidante. Antioksidant je vsaka snov, ki je sposobna že v zelo nizki koncentraciji (v primerjavi s koncentracijo substrata, ki je tarča radikalov) opazno upočasniti ali zavreti oksidacijo substrata (Gutteridge, 1994).

V normalnih pogojih antioksidanti pretvarjajo ROS v vodo, da zmanjšujejo njihovo koncentracijo. Največjo aktivnost imajo encimski antioksidanti, ki nastajajo endogeno (npr. superoksid-dismutaza, katalaza); sledijo jim tako imenovani »blažilci šoka« (npr. albumin, transferin, urat); še bolj šibko aktivnost imajo esencialne spojine (npr. vitamin C in E, aminokisline, koencim Q10, lipoična kislina). Antioksidantni obrambni sistem vključuje encimske in neencimske antioksidante. Encimski antioksidanti nevtralizirajo presežne reaktivne kisikove spojine in jim s tem preprečijo, da bi poškodovale celične strukture. Encimski antioksidanti so superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT) in glutation peroksidaza (GPX). Neencimski antioksidanti ali nizkomolekularni antioksidanti so snovi, ki jih zaužijemo s hrano ali pa nastajajo endogeno. Antioksidanti, ki jih zaužijemo s hrano, so vitamini (vit. C in vit. E); poleg tega s hrano zaužijemo tudi nekatere elemente v sledeh (npr. Se in cink-Zn), ki sicer niso antioksidanti, vendar so kofaktorji antioksidantnih encimov. Nekatere od teh snovi so lahko tudi sintetične in se uporabljajo kot prehranska dopolnila. Eksogeni antioksidanti pomagajo endogenim pri nevtralizaciji ROS oz. zmanjšanju oksidativnega stresa (Aragwal in sod., 2005).

Ker vročinski stres privede do oksidativnega stresa, torej porušenja ravnovesja med oksidanti in antioksidanti v organizmu, lahko z dodajanjem antioksidantov izboljšamo splošno zdravje krav, povečamo in izboljšamo količino in kvaliteto mleka ter izboljšamo reprodukcijske sposobnosti krav in zdravje telet.

Antioksidanti v krmi spodbujajo antioksidantno encimsko aktivnost in pomagajo k preprečevanju reprodukcijskih težav. Kot antioksidanti so pomembni nekateri encimi, katerih sestavni elementi so minerali Se, Cu+Zn, Mn+Zn, Cu, Fe ter vitamini C, E in beta-karoten oz. ostali karotenoidi (Weiss, 1998). Antioksidanti v krmi spodbujajo antioksidantno encimsko

aktivnost in pomagajo pri preprečevanju reprodukcijskih težav. Številne študije so pokazale pozitivne učinke dodajanja različnih vitaminov in mineralov v prehrano živali pri zmanjševanju oksidativnega stresa (Kalmath in Ravindra, 2007). Živalim v času vročinskega stresa primanjkuje vitaminov in mineralov, zato je smiselno dodajanje le-teh v krmne mešanice. Vitamini in minerali pomagajo ohranjati dobro prirejo živali in izboljšati izkoristek hranil; učinkovito nevtralizirajo oksidativni stres in pomagajo krepiti ogrožen imunski sistem vročinsko obremenjenih živali (Horváth in Babinszky, 2018; Saeed in sod., 2019).

2.5.1 Vitamin E

Vit. E ima pomemben učinek na presnovo in deluje kot stabilizator na ostale vitamine; v živalskem organizmu je povezan s presnovo Se in deluje kot antioksidant (Abd Hamid in sod., 2011). To je najmočnejši naravni antioksidant; raziskave dodajanja vit. E k prehrani so dokazale zaščitno vlogo pri mnogih boleznih (Orešnik in Kermauner, 2009). Kot dodatek k prehrani zmanjša koncentracije produktov lipidne peroksidacije in poviša TAS pri različnih obremenitvah organizma. Vit. E je antioksidant, ki ga organizem sam ne more sintetizirati, zato ga je potrebno zaužiti s hrano (Evans, 2000; Harris in sod., 2006).

Chappple (1997) razvršča vit. E v skupino »antioksidantov lovilcev«, ki delujejo kot donorji elektronov, tako da reagirajo z radikali, preden ti reagirajo z drugimi molekulami. S tem, ko odstranjujejo že nastale ROS, preprečuje verižne reakcije nastajanja prostih radikalov. V tej skupini so zraven vit. E med drugim tudi vit. C (askorbinska kislina), β-karoten, urat in bilirubin. Je torej eden izmed najmočnejših lovilcev prostih radikalov; njegovo najmočnejše delovanje je v celičnih membranah. Skupaj s Se sodeluje in ščiti celice pred oksidativnimi poškodbami, ki jih povzročajo prosti radikali kot posledica vročinskega stresa. Organizem uporablja dve poti zaščite s pomočjo vit. E pred poškodbami zaradi oksidacije. Prvi del zaščite je, da vit. E odstranjuje proste radikale ter preprečuje lipidno peroksidacijo, drugi del pa, da encim GPX, ki vsebuje Se, ponovno aktivira vit. E, ki se je zaradi preprečevanja lipidne peroksidacije oksidiral. Mehanizma se med seboj dopolnjujeta. Pri regeneraciji vit. E sodeluje tudi vitamin C, ki oksidiran vit. E ponovno aktivira. Le-ta igra pomembno vlogo tudi pri razvoju in delovanju imunskega sistema. Študije so pokazale, da dodatne količine vit. E v obroku zagotavljajo zaščito pred okužbami s patogenimi mikroorganizmi (McDonald in sod., 2010; Orešnik in Kermauner, 2009). Vit. E se v organizmu ne skladišči, zato je pomembno, da živali z njim redno oskrbujemo. Pomanjkanje pri domačih živalih najpogosteje povzroča degenerativne spremembe v mišičnem tkivu (miopatije), mišično distrofijo, ki lahko zajame celoten mišični okvir, srčne mišice in

trebušne mišice. Živali, ki se hranijo s hrano, ki ne vsebuje vit. E oz. ga vsebuje v premajhnih količinah, so dovzetne za različne infekcijske bolezni. Pri ljudeh je dokazano, da je vit. E kot močan antioksidant vključen v številne fiziološke procese in da je njegovo pomanjkanje povezano z dvigom koncentracije ROS, poškodbami celic in posledično z poškodbami različnih tkiv vključujoč vnetje, kar vodi v različna obolenja (Jain in sod., 1988; Passi in sod., 1991; Kökçam in Naziroğlu, 1999; Briganti in Picardo, 2003).

Koncentracije vit. E v krvni plazmi pri kravah zunaj obporodnega obdobja, ki so višje od 3,5 µg/ml, so zadostne, med 2,5 in 3,5 µg/ml mejne, nižje od 2,5 µg/ml pa prenizke (Wolf in sod., 1998). Weiss in sod. (1997) navajajo, da na vrednosti vit. E v plazmi vpliva faza laktacije, saj so vrednosti konstantne od presušitve do približno 1 tedna pred porodom, nato pa koncentracija vit. E pade za približno 50 % in ostaja nizka do 3. ali do 4. tedna po porodu. Nato se začne dvigovati in pride na normalno oz. zadostno raven šele do 9. tedna po porodu. Zadostne koncentracije omogočajo normalno funkcijo nevtrofilcev ter obrambo pred peroksidacijo med obdobji oksidativnega stresa. Vsebnost vit. E v plazmi in drugih tkivih začne upadati skoraj 15 dni pred telitvijo (Kumagai in Chaipan, 2004); najnižje vrednosti dosega v prvih nekaj dneh po porodu (Oldham in sod., 1991). Goff in Stabel (1990) navajata, da so normalne koncentracije vit. E v plazmi sedem dni pred in sedem dni po porodu 1,05-1,25 µg/mL ob pogoju, da začnejo vrednosti 14. do 21. dan po porodu naraščati. Ta padec v obporodnem obdobju je posledica proizvodnje mleka in nabrekanja vimena, prenosa vitaminov v kolostrum in mleko, hormonskih sprememb ter zaradi zmanjšanja vnosa suhe snovi (Weiss, 1998; Goff in Stabel, 1990). Po treh tednih po porodu koncentracija vit. E v plazmi začne naraščati, seveda ob primerni prehrani. Nižje vrednosti vit. E se pojavijo v obdobju, ko se pri številnih kravah pojavijo presnovne bolezni in oslabitev imunskega sistema, kar vodi npr. v večje tveganje za pojav mastitisa in drugih reprodukcijskih motenj. Višje so vrednosti vit. E, manj težav se pojavlja. Ko je bila npr. plazemska raven vit. E med telitvijo okrog 3 µg/mL, se mastitis pri kravah ni pojavil; manj je bilo tudi reprodukcijskih bolezni (Weiss in sod., 1997). Panda in Kaur (2005) ter Pinotti in sod. (2020) navajajo, da lahko strm padec koncentracije vit. E po porodu zmanjšamo s predporodnim dodajanjem prehranskega dodatka z vit. E. Dodajanje pred porodom in v obporodnem obdobju ima pozitiven učinek na antioksidativni status, imunsko odpornost porodnice, na splošno reprodukcijsko učinkovitost in energijski status krav molznic po porodu (Bouwstra in sod., 2010); učinkovit je zlasti pri preprečevanju okužb vimena in mastitisih (Sharma in Maiti, 2005). Zraven antioksidativnih in imunsko-regulacijskih lastnosti ima vit. E tudi bistveno vlogo pri

presnovi energije, ki je prav tako kritični dejavnik v obdobju telitve in izpostavlja molznice oksidativnemu stresu in posledično okužbam (Dubuc in sod., 2010; Kimura in sod., 2002). Vse več je dokazov, da oksidativni stres v obporodnem obdobju pri molznicah povzroča motnje presnove, ki lahko povzročijo zaostajanje posteljice (Bouwstra in sod., 2010) in posledično težave s plodnostjo (Pontes in sod., 2014; Allison in sod., 2000; Eger in sod., 1985). Študije dokazujejo, da oskrba z vit. E zmanjša incidenco mrtvorojenih telet in zaostale posteljice ter izboljša splošno reprodukcijsko zmogljivost pri molznicah, posredno preko zmanjševanja oksidativnega stresa (Santos in sod. 2010).

2.5.2 Selen

Se štejemo med esencialna hranila nujna za razvoj, rast in zdravje živali; kot sestavni del je potreben za sintezo in normalno delovanje več kot 20 selenoproteinov (El-Boshy in sod., 2015). Predvsem sta poznana encima GPX ter dejodaza I. Pomembno je vpleten predvsem v antioksidativno obrambo celotnega organizma, saj se kot lovilec prostih radikalov vključuje v obrambo pred oksidativnim stresom. Kot naraven antioksidant vpliva na reprodukcijo in rast, ščiti tkiva in je ključnega pomena pri odzivu imunskega sistema. Z lahkoto se prenaša skozi posteljico do fetusa, v mlečno žlezo in jajčeca (Suttle, 2010). Veliko je bilo opravljenih raziskav o pomembni vlogi Se pri antioksidativni zaščiti in tvorbi antioksidativnih encimov v celici; dokazan je njegov pomen za zdravje goveda (Sordillo in Aitken, 2009). Pomanjkanje Se pri kravah je dokazano povezano z značilnimi motnjami plodnosti, in sicer pride pomembno pogosteje do zaostale posteljice, cist na jajčnikih, abortusov v zgodnji brejosti, mrtvorojenih ali šibkih telet, pri bikih do neplodnosti ter slabe gibljivosti semenčic (Babnik, 2013). Pri novorojenih teletih pomanjkanje Se povzroča predvsem bolezni mišic (Ewing in Charlton, 2007). Pomanjkanje pri molznicah se izraža tudi v višjem številu somatskih celic; pogosteje zbolevajo za mastitisom; živali so slabše plodne in dlje časa okrevajo po porodu (Foltys in sod., 2001). Dodajanje Se v prehrano goveda, predvsem pri živalih, ki so samo v hlevu, ima dokazano pozitiven učinek na plodnost (MacPherson in sod., 1984); ob zadostni preskrbljenosti s Se v kombinaciji z vit. E je v čredi manj primerov zastale posteljice (Underwood in Suttle, 1997), manjša pojavnost endometritisa in cist na jajčnikih (Harrison in sod.,1984).

Najpomembnejši vir Se za živali je krma; če ga ne vsebuje dovolj, ga moramo dodajati s krmnimi dodatki, saj le tako lahko dosežemo primeren vnos in zadostno količino v telesu. Dnevne prehranske potrebe po Se pri odraslem govedu so ocenjene na 100 µg/kg suhe snovi, za krave molznice pa 300 µg/kg suhe snovi. Da bi dosegli zadostne količine, lahko zadostuje

dodatni prehranski vnos 0,5 mg/kg suhe snovi; povečanje v koncentraciji Se v prehrani sledi povečanje koncentracije Se v serumu v dveh do šestih dneh po dodatku (Longnecker in sod., 1996; Ellis in sod., 1997). Dodatek Se v prehrani goveda se običajno kaže tudi v povečanju aktivnosti GPX v krvi (Hall in sod., 2013).

S krmo lahko neposredno vplivamo na koncentracijo Se v živalskih proizvodih in s tem na njihovo prehransko vrednost in tehnološko kakovost. Poznamo dva glavna vira Se: anorganski Se (npr. selenit) ter organski Se (npr. selenometionin) (Surai in Fisinin, 2014). Bolje se absorbira Se, ki je vezan v organski obliki – kelati (Orešnik in Kermauner, 2009). Organski Se (v obliki selenometionina ter selenocisteina) se absorbira bolje, kot pa se absorbira Se v anorganski obliki (v obliki selenita ter selenata), saj se absorbira po zakonitostih absorpcije aminokislin (Suttle, 2010). Organski Se se enako absorbira v vseh delih prebavnega trakta, anorganski Se pa se bolje absorbira v tankem črevesu. Z dopolnilom Se v anorganski obliki lahko dvignemo koncentracijo Se v mleku in kolostrumu pri govedu. Pri tem je še bolj učinkovit Se v organski obliki, npr. Se-metionin. Kadar v krmni obrok dodamo Se v organski obliki, lahko pride tudi do osemkrat večjega povečanja, kot pa če bi v krmni obrok dodali anorgansko obliko Se (selenit) (Suttle, 2010).

Kot indikator oskrbe se lahko uporablja dlaka. Normalna raven Se v dlaki goveda je 0,5–1,3 ppm v suhi snovi (Ewing in Charlton, 2007), sicer pa koncentracijo Se pogosteje ugotavljamo na podlagi analize krvne plazme. Različni avtorji navajajo različne zadostne koncentracije. Juniper in sod. (2006) navajajo, da so vrednosti Se v krvni plazmi, ki so pod 120 µg/mL prenizke; optimalne se gibljejo nad 200 µg/mL; Dargatz in Ross (1996) navajata, da je koncentracija med 80 in 160 µg/L zadostna; koncentracije od 51 do 80 µg/L kažejo na mejni primanjkljaj; vse, kar je nižje od 50 µg/L, je že resen deficit. Po navedbah Villarda in sod. (2002) je ustrezna raven Se v plazmi med 51 in 85 µg/L. Harrison in sod. (1984) so primerjali koncentracijo v različnih tkivih oz. tekočinah 30 dni po porodu v odvisnosti od dodajanja kombinacije Se in vit. E in ugotovili, da je bila povprečna vrednost koncentracije Se v skupini, ki je prejemala dodatek Se in vit. E v krvni plazmi 112 µg/L, v FF pa 209 µg/L, v kontrolni skupini krav pa je bila povprečna vrednost Se v plazmi 53 µg/L in v FF pa 159 µg/L.

Neustrezna oskrba s Se pri brejih molznicah lahko pripelje do obolenja srčne mišice pri novorojenih teletih. Hudo pomanjkanje privede do prehitrega poroda (abortusa) ali pogina teleta ob telitvi. Mišične distrofije pri odraslih živalih niso tako pogoste in tako zelo izražene kot pri

mladičih (Orešnik in Kermauner, 2009). Na splošno pri govedu pomanjkanje Se privede do drisk, togih mišic in zastoja srca. Pri kravah pride do pojava zaostale posteljice, cist na jajčnikih, abortusov v zgodnji brejosti, mrtvorojenih ali šibkih telet ter pri bikih do neplodnosti ter slabe gibljivosti semenčic. Pomanjkanje pri molznicah se izraža tudi v višjem številu somatskih celic; pogosteje zbolevajo za mastitisom; živali so slabše plodne in dlje časa okrevajo po porodu (Foltys in sod., 2001). Tudi mlečnost krav na paši je lahko slabša, če v krmi ni dovolj Se in če ga ne dodajamo, saj zato njegova koncentracija v krvi pade pod normalne vrednosti, kar ne vpliva le na slabšo mlečnost, ampak tudi na manjšo vsebnost maščob v mleku (Suttle, 2010).

Vit. E in Se v kombinaciji sta t. i. celična antioksidanta. Njuni antioksidativni funkciji sta medsebojno odvisni; obstaja tesna povezava med koncentracijo Se, vit. E in antioksidativnim statusom ter različnimi težavami oz. okvarami (Chauhan in sod., 2014). Raziskave so pokazale znatno zmanjšan pojav zaostale posteljice in cističnih bolezni jajčnikov pri kravah molznicah, ki so dobile dodatek, ki je vseboval kombinacijo vit. E in Se (Campbell in Miller, 1998; Harrison in sod., 1984; Miller in sod., 1993); skupaj imata ključni pomen pri obrambi telesa pred ROS, izboljšujeta imunsko odpornost in zmanjšujeta pogostnost mastitisov (Brzezinska-Slebodzinska in sod., 1994; Allison in Laven, 2000; Smith in sod., 1984; Weiss in sod., 1997). V raziskavi Arechiga in sod. (1994) je tretiranje s kombinacijo vit. E in Se 21 dni pred pričakovano telitvijo povečalo stopnjo uspešnosti prve osemenitve. Ko pa so enako kombinacijo dodajali 30 dni po telitvi niso opazili razlik v izboljšanju stopnje uspešnosti prve osemenitve. V študiji Campbella in Millerja (1998) je dodatek kombinacije vit. E in Se v odmerku 1000 IE/dan v zadnjih 42 dneh pred porodom zmanjšal trajanje intervala od telitve do prve pojatve.

2.5.3 Glutation peroksidaza (GPX)

GPX je splošno ime družine encimov s peroksidazno aktivnostjo, katerih glavna biološka vloga je zaščita organizma pred oksidativnimi poškodbami (Mates in sod., 1999). GPX so »encimski antioksidanti« in so predvsem v celicah (Chapple, 1997), kjer odstranjuje superokside in perokside, preden se ti v reakcijah s kovinskimi ioni pretvorijo v še aktivnejše spojine. Določanje aktivnosti GPX je koristno pri ocenjevanju statusa Se in pri oceni antioksidantnega statusa. Z merjenjem aktivnosti GPX je mogoče diagnosticirati pomanjkanje Se pri nekaterih vrstah, vendar je pri uporabi te vrednosti kot neposrednega indikatorja statusa Se potrebna previdnost, ker je lahko prisoten polimorfizem v aktivnosti GPX (Mates in sod., 1999).

GPX je encim s štirimi selenovimi ioni kot kofaktorji, ki katalizira razgradnjo H_2O_2 in lipidnih peroksidov z glutationom. Je npr. najpomembnejši obrambni mehanizem pred UV-poškodbami v koži. Za delovanje omenjenega encima je Se torej nujno potreben. Dokazano je, da pomanjkanje poveča peroksidacijo lipidov v kulturah fibroblastov in verjetnost raka pri miših (Kohen, 1999; Steenvoorden in van Henegouven, 1997).

GPX je v celičnem citosolu in matriksu mitohondrijev. Poznamo dve različni obliki GPX, in sicer od Se odvisno in od Se neodvisno. Prve lahko reducirajo tako vodikov peroksid kakor tudi organske perokside, druge pa le vodikov peroksid (Osredkar, 2012). Ker je Se kofaktor GPX, nekateri avtorji navajajo pomanjkanje Se kot enega glavnih možnih vzrokov za znižano aktivnost GPX (Zagrodzki in sod., 2007).

Vaisberg in sod. (2005) so v raziskavi o vlogi od Se odvisnega encima GPX v reprodukcijskih organih in semenu bikov ugotovili pozitivno korelacijo med aktivnostjo GPX v semenu in številom gibljivih semenčic. H_2O_2 blokira gibljivost goveje sperme in vitro (Bilodeau in sod., 2000), GPX ima pomembno vlogo pri njegovem odstranjevanju. Najvišje ravni GPX antioksidativne encimske aktivnosti v FF so pred ovulacijo (Lapointe in sod., 2003). Znatno zmanjšanje aktivnosti GPX pri kravah je zabeleženo en teden po telitvi, saj so vrednosti takrat pomembno nižje v primerjavi s 6. in 9. tednom po telitvi (Konvična in sod. 2015). Zaradi vrhunca laktacije in izločanja kolostruma po porodu prihaja do oksidativnega stresa. Do nadaljnjega znižanja ravni GPX lahko pride tudi sredi laktacije v primerjavi s kontrolnimi vrednostmi. Morebitni razlog za to je lahko fiziološka prilagoditev in prilagajanje živalskega telesa na manjšo proizvodnjo med sredino laktacije in oskrbo s hranili. Znižanje povprečnega GPX v krvi pri kravah molznicah v sredini laktacije je lahko tudi posledica izgube homeostatskega nadzora v poporodnem obdobju (Festila in sod., 2012). Izsledki raziskav glede vrednosti GPX so si sicer nekoliko nasprotujoči. Festila in sod. (2012) navajajo višjo raven GPX med pozno brejostjo v primerjavi z obema fazama laktacije; drugi (Cigliano in sod., 2014; Sharma in sod., 2011) navajajo bistveno višje ravni GPX pri kravah v sredini laktacije v primerjavi z zgodnjo laktacijo in nižjo raven GPX med zgodnjo laktacijo v primerjavi s pozno brejostjo. Tako lahko sklepamo, da so za oksidativni stres odgovorni številni dejavniki, vključno z različnimi fiziološkimi in okoljskimi dejavniki.

2.5.4 Superoksid dismutaza (SOD)

Tudi SOD (tako kot GPX) predstavlja prvo linijo obrambe pred ROS; gre za encimski

antioksidant, ki se nahaja predvsem v celicah (Chapple, 1997), kjer prav tako odstranjuje superokside in perokside. SOD znatno pospeši reakcijo dismutacije, v kateri pretvarja reaktiven $O_2^{\bullet -}$ v manj reaktiven H_2O_2. Katalaza (CAT) ali GPX nato H_2O_2 pretvorita v molekulski kisik in vodo. SOD ščiti dehidrataze pred in aktivacijo s superoksidnim radikalom. Ima pomembno antioksidantno vlogo v skoraj vseh celicah, ki so izpostavljene kisiku. Varuje pred poškodbami DNA, škodljivimi učinki ionizirajočega sevanja ter poškodbami lipidov in beljakovin. SOD potrebuje za delovanje kot kofaktor kovinski ion. Glede na kofaktor uvrščamo superoksidne dismutaze v štiri razrede: Cu, Zn-SOD, Fe-SOD, Ni-SOD in Mn-SOD (Mates, 2000); Cu in Zn vsebujoča superoksid-dismutaza – Cu, Zn-SOD ali SOD1 se nahaja v citoplazmi; Mn vsebujoča superoksid-dismutaza – Mn-SOD ali SOD2 se nahaja predvsem v mitohondrijih; EC-SOD ali SOD3 se nahaja zunaj celic. Pri poskusih na miših (Kinnula in Crapo, 2004) so ugotovili, da popolna odstranitev gena za Mn-SOD vodi v perinatalno smrt; heterozigotne miške z znižano aktivnostjo Mn-SOD so bolj podvržene mitohondrijskim oksidativnim poškodbam. Miške brez gena za Cu Zn-SOD preživijo, vendar se njihove celice delijo počasneje. Preživetje miši brez gena za Mn-SOD je krajše; ob izpostavitvi oksidativnemu stresu pride do močneje izraženih poškodb pljučnega tkiva. Večje količine Mn-SOD se nahajajo v srcu, možganih, jetrih in ledvicah, Cu Zn-SOD v jetrih, ledvicah, eritrocitih in centralnem živčnem sistemu, EC-SOD pa v ožilju, pljučih, maternici in ščitnici.

SOD ima antioksidantno in protivnetno vlogo v telesu. Nivo SOD-a s starostjo upada, nivo radikalov pa narašča, zato raziskujejo SOD za uporabo pri zaviranju procesov staranja (Treiber in sod., 2012); ima močno protivnetno funkcijo in pomembno vlogo pri patoloških rakavih procesih (Segui in sod., 2004).

Raziskave navajajo različne vrednosti SOD; raven plazemske koncentracije SOD je po nekaterih podatkih (Cigliano in sod., 2014) bistveno višja pri kravah v sredini laktacije v primerjavi z začetkom laktacije; v primerjavi s celotnim obdobjem laktacije so najvišje vrednosti SOD prav od treh tednov pred porodom do devet tednov po porodu (Konvična in sod. 2015) ter višjo koncentracijo SOD eritrocitov med zgodnjo laktacijo v primerjavi s pozno brejostjo (Bernabucci in sod., 2002). Povečanje aktivnosti SOD v zgodnji in v sredini laktacije je pokazatelj oksidativnega stresa. Višja serumska aktivnost SOD je lahko posledica fiziološke nadgradnje tega encima v poskusu nevtralizacije/ublažitve izzivov superoksidnih radikalov in prilagajanja živali oksidativnemu stresu v poskusu izboljšanja antioksidantnega statusa (Konvična in sod. 2015).

2.5.5 Skupni oz. totalni antioksidantni status (TAS)

TAS vključuje skupno delovanje vseh antioksidantov v plazmi in telesnih tekočinah ter predstavlja integriran parameter in ne le vsote vseh merljivih antioksidantov (Ghiselli in sod., 2000), daje biološko relevantno informacijo oksidativnega stresa in je odraz dinamičnega razmerja med prostimi radikali in antioksidanti v krvni plazmi. Dodajanje antioksidativnih mineralov, vitaminov ter mikro- in makroelementov ga zvišuje. TAS torej izraža sposobnost organizma za odstranjevanja prostih radikalov in odraža preostalo antioksidativno sposobnost po nevtralizaciji ROS. Nizka aktivnost antioksidativnih encimov ima pomembno vlogo pri napredovanju bolezni in vodi v razvoj oksidativnega stresa. Davies in sod. (2004) opozarjajo, da vrednost parametra TAS sama po sebi pove bolj malo o stanju oksidativnega stresa, saj je lahko npr. nizka vrednost TAS posledica majhnih vrednosti ROS oz. nizke izpostavljenosti in aktivacije sistema ali pa povečane izpostavljenosti ROS in prekomernega izčrpavanja antioksidantov in s tem zmanjšane zaščite pred ROS. Zato je za bolj zanesljivo oceno oksidativnega statusa potrebno upoštevati več različnih parametrov (npr. GPX, SOD, stanje vit. E in Se).

Vročinski stres, zaradi katerega pride do oksidativnega stresa, znižuje vrednosti TAS zaradi znižanja količine antioksidantov. Izčrpavanje TAS, ki nastaja kot posledica oksidativnega stresa, se prekine s pričetkom sproščanja antioksidantov, ki so nakopičeni predvsem v jetrih in maščobnem tkivu ter z indukcijo ali aktivacijo antioksidantnih encimov (Psotová in sod., 2001). V kasnejši fazi oksidativnega stresa vsebnost TAS pade zaradi znižanja količine antioksidantov.

2.6 ANALIZA PLODNOSTI IN PLODNOSTNE MOTNJE

Plodnost krav je neposredno povezana s prirejo mleka, zato je pomembno, da so mere plodnosti vključene v selekcijske programe. Za praktično oceno plodnosti krav je najbolj uporaben podatek doba med telitvama (DMT). Trajanje DMT je odvisno od dolžine poporodnega premora, to je od števila dni, ki pretečejo od telitve do ponovne obrejitve. Trajanje poporodnega premora (PP) pa je odvisno od rejca, ki opazuje pojatve in odloča, pri kateri pojatvi bo krava osemenjena in od uspešnosti osemenitve (Ferčej in Skušek, 1988).

Znanje o osnovnih fizioloških dogajanjih na rodilih in celotnem organizmu telic in krav v času brejosti ter po telitvi je osnova za uspešno vodenje reprodukcije v čredi. Dobro vodenje plodnostnih dogajanj v mlečnih čredah je ključnega pomena za dobro plodnost krav ter

gospodarno in ekonomsko opravičljivo prirejo mleka (Buh, 2010).

Plodnostne motnje pri kravah molznicah povzročajo na kmetijah veliko gospodarsko škodo (Orešnik, 1995). Razmere se iz leta v leto celo slabšajo. Najslabše je na kmetijah, ki se ukvarjajo za vzrejo črno-bele pasme, saj tam opažamo izrazito povečanje PP. Idealno je, da DMT med dvema telitvama pri mlečnih pasmah traja okrog 365 dni; pri manjši mlečnosti krav je zaželena tudi krajša. Neustrezno trajanje DMT je posledica številnih napak v reji krav. Mnogi različni dejavniki spreminjajo plodnost krav; dejavniki vplivajo drug na drugega, zato je ugotovitev razloga za plodnostne motnje na kmetiji toliko težja (Orešnik, 1999).

2.6.1 Pojatveni ciklus in odkrivanje pojatev

Estrusni ali pojatveni ciklus se pri živalih pojavlja kot posledica endokrinih dejavnikov v obliki hormonskega ravnovesja živali. Na potek tega cikla vplivajo različni dejavniki: način reje, prehrana, pasma živali, letni čas, zaporedna telitev, trajanje presušitve, presnovne motnje v poporodnem obdobju. Pojatveni ciklus se pri telicah lahko pojavi že pri starosti devetih mesecev. Prvič jih osemenimo oz. pripustimo, ko dosežejo plemensko zrelost oz. pri starosti 17 do 18 mesecev, vendar je pri tem prav tako pomembna razvitost in telesna masa živali (Šketa, 2000). Pri kravah in plemenskih telicah traja pojatveni ciklus od 18 do 23 dni, v povprečju največkrat 21 dni. Ko je žival breja, pojatveni ciklus izostane. Pojatev lahko traja od 12 do 36 ur, največkrat pa v povprečju 18 ur, redkokdaj lahko tudi samo 3 do 5 ur. Odkrivanje pojatev v čredi in pravočasno osemenjevanje sta ključnega pomena za uspešno osemenitev (Trasch in sod., 2003).

Pojatveni ciklus pri kravah delimo na 4 faze: proestrus (pripravljalna faza, rast foliklov), estrus (faza pojatve, značilno obnašanje, ovulacija), metestrus (začetek razvoja rumenega telesa, priprava na implantacijo), diestrus (prevlada rumenega telesa, progesteronska faza). Proestrus nastopi 17–18 dan ciklusa in traja približno 3 dni. V tem obdobju rumeno telo (CL) lizira; hkrati v krvi naraščajo nivo GnRH, folikel stimulirajočega hormona (FSH) in LH, nivo progesterona pa pada. Prične se rast foliklov, vzpostavitev dominantnega folikla na jajčnikih in izločanje estrogenov; pojavljajo pa se tudi že prvi znaki pojatve (nemir, naskakovanje), ki se nato stopnjujejo. Nivo estrogenov doseže maksimum pred ovulacijo. Estrus oz. pojatev traja 15 do 20 ur. Pride do padca estrogena in FSH, LH doseže vrh. Pojavi se sprememba obnašanja; samice privolijo v paritev. Ovulacija oz. sprostitev jajčne celice nastopi približno 30 ur po začetku estrusa oz. 12 ur po tem, ko že izginejo vedenjski znaki pojatve. V metestrusu, ki sledi estrusu

in traja 3-5 dni, se razvija CL, ki ga spremlja zviševanje ravni izločanja progesterona. Spremeni se obnašanje živali; zunanji znaki pojatve ponehajo. Jajčece je še v jajcevodu; če je prišlo do osemenitve oz. oploditve, je že oplojeno in maternica je na začetku sekretorne faze maternične ciklusa. Diestrus traja od 5. do 17. dne ciklusa in je obdobje brez zunanjih znakov pojatve. Aktivnost rumenega telesa je največja. Dozorelo CL proizvaja progesteron, ki vpliva na povečanje endometrija in miometrija maternice z namenom priprave maternice na ugnezditev zarodka. V tej fazi jajčece že prispe v maternico in v primeru, če je oplojeno, že vzpostavi kontakt s sluznico maternice. Če jajčece ni oplojeno, ob koncu diestrusa estrogen iz dominantnega folikla sproži sintezo uterinega prostaglandina, zato jajčece degenerira in se absorbira; prav tako se razgradi tudi CL. Začne se nov pojatveni ciklus. V primeru brejosti ostanejo ravni progesterona visoke celo brejost; nadaljnjih ovarialnih ciklosov ni. Zarodek prepreči luteolizo in kmalu tudi že sam proizvaja progesteron. CL ostane aktivno skozi celo brejost; njegovo funkcijo sčasoma nadomestita posteljica in nadledvične žleze (Buh, 2010).

Za pravilno odkrivanje pojatev je potrebno dobro poznavanje živali. Krave morajo biti ustrezno označene, da jih lahko prepoznamo. Rejec mora vedeti, katero žival je potrebno v določenem obdobju še posebej pozorno opazovati. To lahko ve le, če si sproti zapisuje podatke v hlevski koledar oziroma z dnevnimi izpisi iz računalnika (Ambrožič, 2000; Orešnik, 1995). Odkrivanje pojatev in pravočasna osemenitev v času pojatve sta odločilnega pomena za uspešno osemenitev krav (Šketa, 2000). Odkrivanje pojatev je delo, ki najbolj spreminja uspešnost reprodukcijskih dogajanj v čredi; pri tem je v celoti v pristojnosti rejca. Pri zdravih čredah krav je nekje od 80 do 90 % pojatvenih ciklusov normalnih in dobro izraženih, a kljub temu rejci uspešno odkrijejo le 55 do 60 % pojatev. Ciljne vrednosti za dobro delo pri odkrivanju pojatev so na nivoju od 80 do 90 %. Skoraj pri 70 % krav traja obdobje izrazitih znamenj pojatve manj kot 12 ur; v 65 % primerov se krava pusti zaskočiti v nočnem času (Buh, 2010).

Na uspešnost odkrivanja pojatev vplivajo tako značilnosti in zdravje krave v reprodukcijskem smislu kot tudi dejavniki vodenja reprodukcije na kmetiji. Pri osemenjevanju krav razlike v uspešnosti odkrivanja pojatev najbolj spreminjajo ocene plodnosti krav v čredi. To izhaja iz preprostega pravila: če pojatve ne odkrijemo, krave ne bomo osemenili in ne bo breja. Uspešnost odkrivanja pojatev vpliva na trajanje obdobij: servisnega intervala (SI), servisne periode (SP), trajanje poporodnega premora (PP) ter dobe med telitvama (DMT). Če odkrijemo vsako pojatev, bo tudi ob slabši uspešnosti osemenitev krava pravočasno breja (Orešnik, 1999).

2.6.2 Pregled plodnostnih parametrov

2.6.2.1 Doba med telitvama (DMT)

DMT je obdobje med dvema zaporednima telitvama in je sestavljena iz PP in dobe brejosti (DB). DMT delimo tudi na dobo laktacije, ki traja normalno 10 do 11 mesecev, in na dobo presušitve, ki naj ne bo daljša od 60 dni. Pri dolgih DMT so navadno krave predolgo suhe in predolgo dajejo manjše količine mleka. Tudi dohodek od vrednosti teleta je pri dolgih DMT na leto in na dan manjši. Vsak dan DMT, ki je daljša od 365 dni, prinaša zmanjšan dohodek za vrednost 10 do 12 kg mleka (Ferčej in Skušek, 1988).

DMT je prav gotovo eden izmed najpomembnejših parametrov plodnosti, vendar ni dovolj natančen. Za boljšo analizo plodnosti lahko DMT razčlenimo na PP in DB. PP je sestavljen iz SI ter SP. Ko imamo vse te podatke, si lahko iz njih ustvarimo jasno sliko plodnosti oz. plodnostnih motenj pri kravah v čredi.

2.6.2.2 Servisni interval (SI)

SI je obdobje od telitve do prve osemenitve. Dolžina SI je odvisna od poteka puerperija, učinkovitosti odkrivanja pojatev, odločitev rejca oz. načrtovane dobe čakanja (NDČ), mlečnosti krav, prehrane, sezone osemenitve in telitve (Pipan, 1991). Pri zdravih kravah molznicah pride do prve ovulacije med 15. in 21. dnem po porodu (Rajamahendran in Taylor, 1990; Savio in sod., 1990) oz. vsaj do 32. dne (Lucy in sod., 1991; Opsomer in sod, 2004). Nekateri avtorji navajajo, da 92 od 97 % živali vzpostavi normalen ciklus do 42. dne (Lamming in Bulman, 1976; McLeod in Williams, 1991). Splošno sprejeto pravilo je, da naj SI pri kravah molznicah ne preseže 60 dni po porodu, kar temelji na dejstvu, da v tem obdobju vse zdrave živali vzpostavijo normalno ovarialno aktivnost in so sposobne izražati zunanje znake pojatve. To obdobje se pokriva z NDČ, upošteva 50 % uspešnost prve osemenitve in PP 85 dni. S tem naj bi dosegli željeno DMT 356 dni (Radostits in sod., 1994).

Čas osemenitve po telitvi neposredno odloča o uspešnosti prve osemenitve. Prepozna osemenitev po telitvi bistveno podaljšuje PP. Prekratek SI, manj kot 50 dni, povzroči slab odstotek uspešnosti osemenitev. Krave z manjšo mlečnostjo osemenjujemo prej, krave z večjo mlečnostjo pa pozneje. Najprimernejši čas osemenjevanja je med 50. in 80. dnem po telitvi, vendar je glede na mlečnost v laktaciji lahko ta čas tudi podaljšan na 100 do 120 dni brez neugodnega vpliva na mlečnost. Prvesnice neodvisno od mlečnosti semenimo po 70. dnevu po telitvi, da jim s tem omogočimo dosego končne odrasle velikosti. Prekratek SI povzroči slabši

odstotek uspešnosti prve osemenitve; še posebej se ta pojav kaže v visoko proizvodnih čredah (Orešnik, 1995).

2.6.2.3 Servisna perioda (SP)

SP je obdobje od prve do uspešne osemenitve pri kravah, ki po prvi osemenitvi niso ostale breje; je naslednji parameter za ocenjevanje plodnosti krav v čredi in daje možnost za odkrivanje vzrokov za podaljšane dobe med telitvama. Na trajanje SP v veliki meri vplivajo uspešnost osemenitev, učinkovitost in zanesljivost odkrivanja pojatev, osemenitev zunaj pojatve, zgodnja embrionalna smrtnost, ciste in druge nepravilnosti na jajčnikih, anestrija, aciklija in prehrana živali. Normalne povprečne vrednosti za trajanje SP niso navedene. Povzetek vseh raziskav lahko strnemo v ugotovitev, da naj bi bilo trajanje SP čim krajše oz. se mora približati enaindvajsetim dnem (Orešnik, 1995). Izračunamo jo tako, da od datuma uspešne osemenitve odštejemo datum prve osemenitve (Pipan, 1991).

2.6.2.4 Poporodni premor (PP)

PP je obdobje od telitve do uspešne osemenitve oz. ponovne obrejitve, Optimalno naj bi to obdobje trajalo okrog 85 dni, da bi s tem dosegli želeno dobo med telitvama DMT 356 dni (Radostits in sod., 1994). Razlogi za podaljšanje PP so številni in zelo različni; najpogosteje navajajo slabo odkrivanje pojatev, dolg SI in NDČ, slabo uspešnost osemenitve, NEB in bolezni, povezane z njo (Pipan, 1991; Opsomer in sod, 2004).

Trajanje PP je seštevek trajanja SI in SP pri kravah, pri katerih prva osemenitev ni bila uspešna. Če je uspešna že prva osemenitev, je SP nič in je torej PP enak SI. Ciljno trajanje povprečnega PP je odvisno od mlečnosti vsake posamezne krave in povprečne mlečnosti črede. Cilj si mora postaviti vsak rejec sam na podlagi lastnih podatkov. Okvirne vrednosti se gibljejo:

- pri mlečnosti okrog 5.000 kg mleka v standardni laktaciji (305 dni) naj bi bila dolžina PP 80 dni;
- pri zelo majhni mlečnosti (okrog 3.000 kg mleka v standardni laktaciji) je PP lahko celo bistveno krajši;
- pri večjih mlečnostih (nad 7.000 kg mleka v standardni laktaciji) lahko traja PP tudi 120 dni, ne da bi neugodno vplival na doseženo povprečno mlečnost na krmni dan v čredi (Orešnik, 1995).

2.6.2.5 Indeks uspešnosti osemenitve (IUO)

IUO predstavlja razmerje med številom vseh osemenitev in številom brejih krav. Pove nam, koliko osemenitev je potrebnih za obrejitev živali (Podpečan, 2005). Zaželene vrednosti se gibljejo med 1,5 in 1,6 (Orešnik, 1995).

2.6.3 Plodnostne motnje ter spremljanje patoloških dogajanj na rodilih in jajčnikih

Reprodukcijske motnje in bolezni, kot so zaostala posteljica, endometritis ali metritis, imajo velik vpliv na gospodarski donos mlečnih kmetij, saj niso povezane samo s stroški zdravljenja, temveč tudi s slabo plodnostjo in zmanjšano prirejo mleka. Etiologija teh bolezni ni povsem raziskana, vendar se pogosto povezuje z oslabljeno antioksidativno aktivnostjo (Kankofer, 2000).

2.6.3.1 Vnetje maternice

Endometritis (brez zaostale posteljice) je poporodni vnetni proces maternične sluznice. Kadar vnetje napreduje in se vname tudi maternica (maternična votlina in celotna maternična stena), govorimo o metritisu. Še bolj nevarna bolezen maternice pa je piometra ali gnojno vnetje maternice, pri kateri gre za močno infekcijo celotne maternice in nabiranje gnojne tekočine v maternici.

Endometritis je nevarna bolezen, ki lahko povzroča neplodnost krav; obolenje poteka z različno intenziteto. V začetni fazi se lahko pojavi gnojni izcedek iz vagine; maternica je na otip trda in neobčutljiva, ob tem pa so sistemski znaki redki; tudi mlečnost in apetit običajno nista prizadeta. Pri hujšem poteku bolezni žival izgubi apetit; zmanjša se tudi količina mleka. Za diagnozo tega stanja je potrebna citologija endometrija, biopsija ali katera koli druga metoda, ki lahko dokaže prisotnost vnetja endometrija, kot je npr. ultrazvok, s pomočjo katerega se oceni prisotnost tekočine v maternici in premer maternice (Arias in sod., 2018). Identifikacija subkliničnega endometritisa s standardnimi metodami ni vedno zanesljiva. Subklinični endometritis predstavlja stanje, kjer maternični bris vsebuje nad 18 % nevtrofilnih granulocitov 20 – 33 dni po porodu ali nad 10 % 34–47 dni po porodu (Kasimanickam in sod., 2004). Tega stanja ni mogoče odkriti samo z rutinskim transrektalnim pregledom, še posebej, če je maternični vrat zaprt in vaginalna sluz ni vidna. Sum na endometritis kaže prisotna anehogena tekočina z ehogenimi ali hiperehogenimi »kosmiči«, vidnimi na ultrazvočnem monitorju; najbolj natančna je kombinacija ultrazvoka in citologije brisa maternice (Čengić in sod., 2012).

Različni raziskovalci (Le Blanc in sod., 2002; Gautam in sod., 2009; Kasimanickam in sod.,

2004; Sheldon in sod., 2006) pojav endometritisa povezujejo s poškodbami maternične sluznice ob težjem poteku poroda, slabih higienskih pogojih v hlevu, okužbah kot posledica uporabe nesterilnih instrumentov med porodom. Pogosto bolezen sovpada z abortusom, ki je lahko posledica katere izmed nalezljivih bolezni (bruceloza, klamidioza); kasneje se pojav endometritisa povezuje s podaljšanim poporodnim intervalom oz. kasnejšo uspešno osemenitvijo molznice (Gautam in sod., 2009).

K endometritisu so bolj nagnjene živali, ki preko krme ne dobijo dovolj vitaminov in mineralov; predvsem je značilno pomanjkanje vit. A, D, E ter Se (Sheldon in sod., 2006). Lahko se pojavi kot posledica presnovnih motenj, NEB ali drugih nespecifičnih bolezni; več študij je pokazalo, da presežek maščobnega tkiva in visoke serumske koncentracije NEFA predstavljajo dejavnik tveganja za poporodne vnetne bolezni pri kravah molznicah (Goff, 2006; Gautam in sod., 2009; Bernabucci in sod., 2005). Poleg tega lahko oksidativni stres prispeva k nenormalnemu vnetnemu odzivu po porodu (Sordillo in Aitken, 2009). Rezultati študije Kizila in sod. (2010) so pokazali, da je pri kravah z endometritisom oslabljen antioksidativni obrambni sistem in da so zato reakcije peroksidacije pospešene. Povečanje presnove kisika po porodu poveča stopnjo proizvodnje ROS. Zaradi teh vzrokov se pojavi akutni endometritis. Če se ne ozdravi pravočasno, se lahko pojavi kronični endometritis, ki pogosto vodi v trajno neplodnost živali.

Do 40 % krav molznic je v prvem tednu po telitvi izpostavljenih bolezni maternice. Endometritis je prisoten pri približno 50 % krav v 21 dneh po porodu; pojavi se pri 15–20 % vseh krav po porodu zaradi vztrajne bakterijske rasti 3 tedne ali več po porodu (Sheldon in sod., 2006 Sheldon in sod., 2009). Gautam in sod., 2009 navajajo, da je bila skupna prevalenca endometritisa v zgodnjem poporodnem obdobju (15–20 dni) 67,8 %, v vmesnem (21–28 dni) 40,5 % in poznem (29–60 dni) 14,4 %. Pogosto se pojavi v kombinaciji z zaostalo posteljico, rojstvom dvojčkov, težkim porodom ali prezgodnjim porodom (Lewis, 1997; Sheldon in sod., 2006).

2.6.3.2 Zaostala posteljica (retencija sekundin – RS)

Ob normalnem poteku se posteljica pri govedu izloči v treh do osmih urah po porodu. O pojavu RS govorimo, ko le-ta ne izloči v 24 urah po porodu. Pogosteje se pojavlja pri govedu mlečnih pasem (5-15 %), ki je presnovno bolj obremenjeno. Večkrat se pojavlja po abortusu (še posebno bruceloznem abortusu), prezgodnjem porodu ali sprožitvi poroda, distociji (težkem porodu), dvojčkih, mrtvorojenih teletih, hipokalcemiji, pri starejših kravah ali kot posledica neprimerne

prehrane (LeBlanc, 2010a). Pri visoko produktivnih mlečnih kravah ga povezujejo s presnovnim stresom, ki je posledica hormonskih in presnovnih nihanj, NEB, pomanjkanja beljakovin, mineralov in vitaminov, ki so potrebni za zadovoljitev potreb ploda in začetek laktacije (Mordak in Stewart, 2015). Povečana koncentracija NEFA pred porodom, zlasti kadar je njihova raven nad 0,4 mmol/l v 7–10 v dneh pred pričakovano telitvijo, je povezana s povečanim tveganjem za RS, kot tudi za druge zdravstvene težave po porodu, kot je izpad nožnice (LeBlanc, 2010a). V nekaterih primerih pojava retencij v čredi se je kot vzrok pokazalo pomanjkanje vit. E in Se (Mordak in Stewart, 2015). Bionaz in sod. (2007) navajajo, da se z diagnozo RS povezujejo zmanjšane koncentracije vit. A, E in kalcija, zmanjšana vrednosti TAS ter povečane koncentracije NEFA in BHB. Oksidativni stres in njegove imunsko-supresivne posledice se povezujejo z RS kot posledica pomanjkanja vit. E in A ter tudi zaradi pomanjkanja mikro- oz. makroelementov, kot so Se, Zn, Cu in Cr v prehrani (Kendall in Bone, 2006). Učinkovitost dodatka vit. E pri zmanjševanju incidence RS ni bila vedno dokazana, saj nekatere študije (Politis, 2012) niso pokazala pozitivnega učinka. Pri živalih z RS je povečano tveganje za nastanek metritisa, ketoze, dislokacije siriščnika, mastitisa in abortusa v prihodnji brejosti, lahko pa se retencija ponovi pri naslednjih porodih (LeBlanc, 2010a). Diagnozo zanesljivo postavimo, ko opazimo degeneriran del plodovih ovojnic, ki visi iz vulve 24 ur ali več po porodu; običajno lastniki opozorijo, da se krava ni »počistila«. V nekaterih primerih ostanejo plodove ovojnice v maternici, opazimo pa zelo smrdeč izcedek iz vulve. V večini primerov splošno stanje živali ni prizadeto, vendar pa lahko pride do toksemije, pri kateri pride tudi do sistemskih sprememb (povišana temperatura, neješčnost, otožnost..).Več študij kaže, da se pri 50-80 % krav z RS pojavi tudi povišana telesna temperatura vsaj en dan v desetih dneh po porodu (Davies in sod., 2004).

2.6.3.3 Izostanek pojatvenega ciklusa v poporodnem obdobju

Pojatev je definirana kot vrsta spolnega obnašanja v času blizu ovulacije in se kaže v privolitvi samice v spolni akt s samcem. Med »normalno« pojatvijo lahko pri kravah opazimo glasno oglašanje, zaskakovanje drugih krav, ovohavanje, prestopanje na mestu, vaginalno sluz, oteklo in pordelo vulvo, uleknjen hrbet, dnevno zmanjšanje proizvodnje mleka in zmanjšan apetit. Zunanji znaki se pojavijo 14. do 35. dan po porodu. Če znaki pojatve izostanejo ali niso vidni, govorimo o anestrusu. To je sicer normalen pojav, ki se kaže v določenih fizioloških stanjih, npr. v obdobju brejosti, postane pa patološki, ko njegovo trajanje preseže 60 dni po porodu. V 60 dneh po porodu večina zdravih živali vzpostavi normalno ovarialno aktivnost in so sposobne

izražati zunanje znake pojatve. Živali, ki ne izrazijo zunanjih znakov pojatve ali pa le-ti niso opazni v 60 dneh po porodu, morajo biti zdravstveno pregledane (Opsomer, 1999; Radostits in sod., 1994). Najpogostejši vzroki za izostanek pojatve so subestrus ali »tiha« pojatev, »pravi« anestrus, piometra in ovarialne ciste (COD - Cystic Ovarian Disease) (Opsomer, 1999).

Gospodarnost prireje mleka je tesno povezana z reprodukcijo in morebitna izostala pojatev pri kravi zmanjša njeno prirejo mleka v dneh laktacije. Izostanek pojatve do 60. dne po porodu velja za patološko stanje in v polovici primerov gre za tiho pojatev, ki je ena najpogostejših reprodukcijskih motenj in pomeni finančno izgubo kmetije zaradi podaljšanja dobe med telitvama (Yamauchi in sod., 2002). Subestrus ali »tiha« pojatev dejansko pomeni odsotnost zunanjih znakov pojatve v pričakovanem obdobju 60 dni po porodu, ki se sicer pojavijo ciklično ob ovulaciji, a pri kravi hkrati pride do hormonskih sprememb, ki se pojavijo v reproduktivnem sistemu med ciklusom. Da gre pri živali za normalno cikličnost, lahko dokažemo z rektalnim pregledom ali analizo progesteronskega profila (Opsomer, 1999). Običajno estrus traja približno 18 ur, pri telicah približno 16 ur. Pri približno 20 % živali lahko estrus opazimo le 6 ur; poleg tega se znaki pojatve pogosto pokažejo šele ponoči, zaradi česar je zelo težko pravilno zaznati pojatev in s tem pravočasno osemeniti. V čredah, ki so pravilno opazovane, mora biti stopnja odkritih pojatev vsaj 80 % (Zduńczyk in sod, 2009). Vzrokov za pojav tihe pojatve je več. Sprva je pojav veljal za napako v reji oz. kot posledica nepravilnega ali prekratkega opazovanja, nepravilnega časa osemenitve ali celo nepravilne izvedbe osemenitve. Vendar pa je glavni vzrok hormonsko neravnovesje, saj so krvne preiskave pokazale, da so imele krave oz. telice nižje ravni estradiola in nižje ravni progesterona kot krave v obdobju estrusa z vidnimi znaki pojatve. Progesteron je skupaj z estrogenom nujen za izražanje vidnih znakov pojatve; še posebej pogosto opažamo tiho pojatev pri telicah ob prvi ovulaciji, ker se še ne proizvaja dovolj progesterona (Khan in sod.. 2015). Zmanjšana proizvodnja teh hormonov je lahko posledica neustrezne prehrane krav na začetku laktacije, predvsem pomanjkanja energije v obroku. To vodi do zmanjšanja proizvodnje gonadoliberina iz hipotalamusa, posledično do zmanjšanja proizvodnje gonadotropina iz hipofize in s tem do manjše rasti ovarijskih foliklov in nazadnje do nižje ravni proizvodnje estrogenov. Nižja kot je proizvodnja hormonov, manj vidni so zunanji znaki pojatve (Zduńczyk in sod, 2009). Poleg nepravilne uravnoteženosti krmnega obroka je pomembno tudi pomanjkanje vitaminov, mineralov ali preveč izoflavonov. Največ tihih pojatev je na prehodu iz zime v zgodnjo pomlad, kar je lahko povezano s slabšimi pogoji vzdrževanja in spremembami v prehrani (Khan in sod.. 2015).

Na izražanje zunanjih znakov pojatve ima negativen vpliv tudi visoko mlečna proizvodnja (Harrison in sod., 1990). Lopez in sod., (2004) ugotavljajo, da ne le, da so pri visokoproduktivnih molznicah znaki pojatve slabši; tudi pojatev je v povprečju krajša za sedem ur. Intenzivnejša presnova zaradi večje mlečnosti in povečanega pretoka krvi skozi jetra vpliva na zniževanje koncentracije steroidnih hormonov, predvsem progesterona in estrogena v krvi. Tudi vročinski stres ima negativen vpliv na estrusno obnašanje krav, zato lahko govorimo o t. i. poletni anestriji (Khan in sod.. 2015). Vročinski stres povzroči povečano izločanje kortizola in ta hormon blokira spolno vedenje, ki ga povzročajo estrogeni. Učinek vročinskega stresa na obnašanje v pojatvi vključuje tudi dogajanja, neodvisna od hipofizno-nadledvične osi, ki zmanjšujejo aktivnost jajčnikov in razvoj foliklov. Vročinski stres povzroči zmanjšanje perifernih koncentracij estrogenov ob pojatvi. Poleg tega je zmanjšana telesna aktivnost verjetno tudi prilagoditveni odziv, ki omejuje proizvodnjo toplote in zmanjšano aktivnost v pojatvi.

Prva in najučinkovitejša rešitev je uravnoteženje krmnega obroka, prilagojeno potrebam živali, druga je individualna analiza reprodukcijskih ciklusov vsake krave in uporaba črednega koledarja, tretja pa uporaba računalniških sistemov za zaznavanje pojatev, ki lahko zaznajo tudi tiho pojatev. S sočasnim spremljanjem sprememb v aktivnosti živali, zaužitju krme in dnevni mlečnosti lahko še bolj učinkovito odkrijemo pojatve, kar vpliva na izboljšanje reprodukcijskih parametrov in s tem donosnost prireja mleka (Zduńczyk in sod, 2009).

O ***»pravem« anestrusu*** oz. acikliji govorimo pri živalih z nizko koncentracijo progesterona v mleku ali krvi, z neaktivnimi jajčniki ali jajčniki s slabo folikularno aktivnostjo (Opsomer, 1999). Za postavitev diagnoze ne zadostuje zgolj en rektalni pregled, saj lahko živali, pregledane neposredno po ovulaciji, ko še rumeno telo (CL) ni formirano, zmotno štejemo za anestrične. Zato sta potrebna vsaj dva pregleda v intervalu od sedem do deset dni. 90 do 95 % odstotkov krav vzpostavi normalno cikličnost do 60. dne po porodu (McLeod in Williams, 1991; Opsomer 1999), prvi statistično značilni dvig koncentracije progesterona v krvi ali v mleku, ki je znak vzpostavitve ovarialne aktivnosti jajčnikov, se običajno pojavi 20. do 37. dne po porodu (Opsomer, 1999). Dolžina anestrije je odvisna od dejavnikov okolja, dednosti (pasma), starosti krave, sesanja teleta (zvišuje se prolaktin, zavira GnRH), zdravstvenega stanja krave (endometritis) in količine mleka ter prehrane (NEB, ketoza). Mehanizem vpliva izrazite NEB na ovarialno aktivnost krav po porodu še ni popolnoma razjasnjen (Podpečan, 2005). Butler in Smith (1989) in Butler (2000) navajajo, da se različne, med seboj povezane presnovne

poti glukoze, inzulina in endogenih opioidov končno odražajo v zniževanju koncentracije plazemskega LH z zmanjševanjem odzivnosti hipofize na GnRH (Schallenberger, 1990). NEB je neposredno povezan z daljšim poporodnim intervalom do prve ovulacije in nižjo stopnjo oploditve. Zamude pri začetku normalne aktivnosti jajčnikov, s čimer se omeji število pojatvenih ciklusov, lahko povzročijo zmanjšanje plodnosti. NEB verjetno deluje podobno kot podhranjenost in se lahko kaže v zapozneli aktivnosti jajčnikov, tako da vpliva na nižje izločanje LH. Nižja razpoložljivost glukoze in inzulina lahko tudi zmanjša pulznost LH ali omeji odzivnost jajčnikov na gonadotropine (Schallenberger, 1990). Alternativno lahko sproščanje endogenih opioidov v povezavi s povečanim vnosom krme ali drugimi odzivi laktacijskih hormonov povzroči nevralno ali hipofizno inhibicijo pulzirajoče proizvodnje LH, ki je potrebna za razvoj foliklov na jajčnikih. Dokazan je neposreden toksičen vpliv NEFA na proliferacijo granuloznih celic dominantnega folikla (Vanholder in sod, 2005) in povezava med spremembo koncentracije sečnine in BHB v krvi ter FF dominantnega folikla (Leroy in sod., 2004). Metaboliti, ki nastajajo pri izrazitem hujšanju krav in ob izraženi NEB, imajo negativen vpliv na kvaliteto jajčne celice (Vanholder in sod, 2005).

2.6.3.4 Cistično obolenje jajčnikov (Cystic Ovarian Disease - COD)

Cistično obolenje jajčnikov oz. COD je eno izmed pogostih patoloških stanj, ki vodijo do poporodnega anestrusa. Jajčniki so cistični, če vsebujejo eno ali več s tekočino napolnjenih folikularnih struktur premera več kot 2,5 cm, ki so prisotne več kot 10 dni in na nobenem od jajčnikov ni razvitega rumenega telesa (CL) (Lopez-Diaz in Bosu, 1992; Opsomer, 1999). Novejše navedbe (Bors in Bors, 2020; Silvia in sod., 2002) pa o cistični degeneraciji na jajčnikih govorijo tedaj, kadar so prisotne folikularne strukture s premerom najmanj 1,7 cm, ki vztrajajo na jajčniku več kot 6 dni ob odsotnosti CL in očitno motijo normalno cikličnost jajčnikov. Anestrus je najpomembnejši klinični znak, opažen pri molznicah s to diagnozo. Najpogosteje se pojavljajo v zgodnjem poporodnem obdobju med 30. in 60. dnem; pogostost pojavljanja se giblje okrog 20 %, zato so resen vzrok za reprodukcijske motnje pri molznicah (Bors in Bors, 2020). Nekateri avtorji (Day, 1991; Lopez-Diaz in Bosu, 1992) navajajo celo višje odstotke pojavljanja, cca 30 % krav, saj od 20 do 60 % cist spontano izgine. Ločimo več vrst ovarialnih cist, ki se razvijejo iz neovuliranega folikla: folikularne in luteinske ciste ter cistično CL. Folikularne ciste so posamično ali v skupinah na enem ali obeh jajčnikih, imajo tanko steno in ne vsebujejo luteinskega tkiva, kar se odraža v nizkih koncentracijah progesterona. Nastanejo iz neovuliranih foliklov, najbrž zaradi premajhne koncentracije hormonov, ki uravnavajo

ovulacijo (Bors in Bors, 2020). Poleg že prisotnega folikla lahko zraste še več drugih. Folikularne ciste so sposobne izločati nekatere estrogene in androgene hormone; temu primerni so tudi klinični znaki, ki se kažejo v številnih stanjih od odsotnosti pojatve, podaljšanega ali stalnega estrusa (nimfomanije) do maskulinizacije in bikovskega obnašanja (Day, 1991). Luteinske ciste so folikularne strukture z debelo steno in so podvržene delni luteinizaciji brez ovulacije; običajno so to posamezne strukture na jajčnikih. Nastanejo iz foliklov, ki niso ovulirali, koncentracija LH pa je bila vseeno dovolj visoka, da je povzročila luteinizacijo. Za to vrsto cist je značilna anestrija. Omenjeni vrsti cist sta dva obraza iste bolezni (Podpečan, 2005), saj so ciste dinamične strukture, ki se pojavljajo, regresirajo, persistirajo ali pa celo prehajajo druga v drugo (Cook in sod., 1990). Razlika med folikularnimi in luteinskimi cistami je torej, da je pri folikularnih stena tanjša od 3 mm in pri luteinskih debelejša od 3 mm (Bors in Bors, 2020). Cistično CL, ki vsebuje s tekočino napolnjeno centralno votlino različnih velikosti, se pojavi 5. do 7. dan po pojatvi in nima vpliva na normalen pojatveni ciklus oz. brejost. To niso patološke strukture, saj nastanejo po ovulaciji, izvajajo normalno sintezo progesterona in ne vplivajo na dolžino pojatvenega ciklusa.

Dejavniki, ki povzročajo nagnjenost k cistam na jajčnikih, vključujejo presnovne bolezni, NEB, visoko mlečno produktivnost, pojav RS, težek porod, vročinski stres in genetske predispozicije (krava potomka cistične krave) (Bors in Bors, 2020). Beam (1995) je pri kravah s cistami na jajčnikih zabeležil povečano mlečnost in zmanjšano mobilizacijo telesnih rezerv sorazmerno s proizvodnjo mleka. To razkriva, da so lahko razlike v izrabi/razdelitvi energije med cističnimi in zdravimi kravami dejavnik tveganja za razvoj cist na jajčnikih. Pogostost pojavljanja cist na jajčnikih se povečuje s proizvodnjo mleka. Visoka mlečnost v prvih dneh po porodu sovpada z najbolj izrazito NEB oz. višja mlečnost povzroči izrazito NEB, s katero je povezanih več hormonskih in presnovnih prilagoditev, ki lahko vplivajo na delovanje jajčnikov. Toda natančen mehanizem, ki povzroča ciste na jajčnikih, še vedno ni jasen. Možno je, da med NEB pride do mobilizacije NEFA iz maščobnega tkiva. Tako se ustvari njihova višja koncentracija v FF cističnih foliklov, kar bi lahko škodovalo folikularnim celicam in ogrozilo normalno folikulogenezo jajčnikov, vključno z ovulacijo. To pa predstavlja neugodno mikrookolje za ponovno vzpostavitev aktivnosti jajčnikov in je lahko vzrok za obstojnost foliklov in ponovitev cist na jajčnikih (Beam, 1995; Bors in Bors, 2020). Tudi okoljski dejavniki so se izkazali kot povezani s tveganjem za razvoj cist na jajčnikih. Opsomer in sod. (2000) navajajo, da obstaja 5,7-krat večje tveganje za pojav cist na jajčnikih pri molznicah, ki telijo v zaprtih prostorih

(hlevu) v primerjavi s telitvijo na pašnikih. Simensen in sod. (2010) so odkrili manj diagnoz cist na jajčnikih pri kravah v prosti reji v primerjavi kravami v hlevih s privezi. Študija (López-Gatius, 2003), izvedena v Španiji, je opredelila letni čas kot dejavnik tveganja za visoko pojavnost cist na jajčnikih. Ta študija je pokazala, da je bilo pri kravah, ki so telile poleti, 2,6-krat večja verjetnost za razvoj te motnje v primerjavi s kravami, ki so telile pozimi. Raziskovalci so kot vzrok za višjo pojavnost cist opredelili vročinski stres. López-Gatius in sod. (2002) so kot dejavnike tveganja za razvoj cist na jajčnikih opredelili nekatere specifike in motnje po porodu, kot so dvojčki, RS, metritis in ketoza. Poleg tega kot dejavnik tveganja za razvoj cist na jajčnikih navajajo visoko mlečnost v obdobju puerperija; ugotovili so še, da so starejše krave bolj dovzetne za to motnjo v primerjavi z mlajšimi kravami v zgodnji laktaciji. Čeprav so bili številni dejavniki tveganja povezani z verjetnostjo za nastanek cist na jajčnikih, večina študij prepoznava visoko mlečnost kot najpomembnejšega. Mlečnost pa je povezana s presnovnim, genetskim in zdravstvenim statusom krave (Bors in Bors, 2020).

Metoda diagnosticiranja fizioloških in patoloških procesov na rodilih ultrasonografija (UZ) ali pregled rodil z ultrazvokom je neinvazivna, hitra, ekonomična in enostavna diagnostična metoda, ki ne predstavlja nobene nevarnosti za preiskovano žival, omogoča pa natančen vpogled v fiziološko in patološko dogajanje na reprodukcijskih organih. Zahteva poznavanje anatomije in klinične izkušnje pregledovalca pri diagnostiki patoloških sprememb organov (Mrkun, 2012). Z ultrazvočno preiskavo rodil lahko diagnosticiramo morebitno patologijo maternice in jajčnikov in ocenimo, ali ima pravilen pojatveni ciklus (je ciklična). Preiskava nam omogoča tudi zgodnje odkrivanje nebrejih živali, odkrivanje dvojčkov in embrionalne smrtnosti, spremljanje odziva na terapijo ali sinhronizacijo ciklusa, odkrivanje patologije rodil kmalu po telitvi, potrjevanje brejosti in pregled plodu (Colazo in sod., 2010). Spremljamo lahko odzivnost jajčnikov na hormonalne stimulacije, preučujemo rast foliklov in dozorevanje rumenih teles, involucijo maternice ter tudi za ugotavljanje patoloških sprememb, kot so metritis, piometra, maceracija in mumifikacija ploda ter za diferencialno diagnostiko cističnih sprememb, abcesov in tumorjev na jajčnikih (Podpečan, 2005).

Pri UZ preiskavi maternice lahko opazimo intrauterino tekočino, ki je v manjši količini fiziološka v času proestrusa in estrusa ter patološka v diestrusu. Intrauterina tekočina z ehogenimi ali hiperehogenimi delci je običajno patogena. Pri UZ preiskavi ovarijev lahko vidimo folikle, večje od 3-4 mm, CL ter luteinske in folikularne ciste. S pomočjo spremljanja morfologije maternice, števila in velikosti foliklov ter prisotnosti in videza CL lahko določimo

fazo pojatvenega ciklusa (Colazo in sod., 2010).

2.6.3.5 Involucija maternice in motnje v involuciji maternice

Po porodu nastopi poporodno obdobje – puerperij, ko se mora nazaj vzpostaviti pojatveni ciklus in ko se morajo rodila povrniti v stanje pred gravidnostjo; govorimo o t. i. involuciji maternice. Involucija maternice po telitvi je kompleksen proces, ki vključuje fizično krčenje maternice, nekrozo, luščenje karunkularne snovi, regeneracijo endometrija, izločanje lohij, odstranitev bakterijske kontaminacije, anatomsko in histološko obnovo maternice ter vrnitev cikličnosti jajčnikov (Čengić in sod, 2012). Čeprav je maternica po porodu lahko kontaminirana z različnimi bakterijami, to ni nujno povezano s klinično boleznijo (Arthur in sod., 1996). Pojav bakterij po porodu znotraj maternice je pogost, saj jih najdemo v več kot 90 % primerov ne glede na prisotnost kliničnih znakov oz. obolenj (Čengić in sod, 2012).

Neposredno po porodu je maternica kot velika vreča, dolga en meter in težka od devet do deset kg (Kaidi in sod., 1991; Hussein in Daniel, 1991). Najintenzivnejše spremembe se dogajajo v prvih dneh po porodu, ko se miofibrile miometrija krčijo in atrofirajo, njihova dolžina pa se skrajša skoraj štirikrat. Maternični vrat se po normalni telitvi zapira zelo hitro; po 10 do 12 urah znaša njegov premer okoli deset cm, po 96 urah pa je odprt le še za dva prsta (Arthur in sod., 1996). V poporodnem obdobju se pojavi maternični izloček ali lohije, ki je sestavljen iz sluzi, krvi, plodnih tekočin in ostankov posteljice ter materničnega tkiva. Lohije se morajo ob hkratnem zmanjšanju in krčenju maternice izločiti do 15. dne po porodu, sicer je involucija podaljšana. Involucija je zaključena, ko se oba maternična rogova vrneta v premer, kakršnega sta imela pred brejostjo, ko sta na dnu medenične votline ter imata normalen tonus in konsistenco (Hussain in Daniel, 1991) oz. ko se UZ merjena premera obeh rogov med dvema pregledoma ne spreminjata več (Kamimura in sod., 1993). Če takoj po porodu opravimo rektalni pregled, bomo normalno tipali čvrsto maternico z vzdolžnimi žlebovi. Če pa involucija ne poteka, je površina tanka in gladka. V prvih treh tednih po porodu pride do najhitrejšega krčenja materničnih rogov (Kamimura in sod, 1993); v četrtem tednu se hitrost krčenja premera materničnega roga upočasni in od petega tedna naprej ostane na približno enaki ravni.

Čas trajanja do popolne involucije je po navedbah avtorjev zelo različen, traja od 25 do 56 dni (Kaidi in sod, 1991, Hussein in Daniel, 1991; Kamimura in sod., 1993), saj različni avtorji uporabljajo različne pristope in kriterije, s katerimi opredeljujejo popolno involucijo. Williams in sod. (1995) navajajo, da traja časovni interval od poroda do konca involucije 23 do 42 dni.

V isti študiji je bilo ugotovljeno, da je največ krav (51,4 %) zaključilo involucijo v obdobju od 29 do 35 dni po porodu. Najintenzivnejše involucijske spremembe se zgodijo do 25. dne po porodu, ko je premer maternicnega roga 20–40 mm in sta oba roga približno enako velika (Leslie, 1983). Poporodna anestrija je krajša pri mlečnih kravah in daljša pri mesnih pasmah in kravah, kjer teleta sesajo večkrat na dan. 50. dan po porodu je 95 % mlečnih krav že v ciklusu. Involucija maternice pri kravah molznicah se lahko zaključi že po 15 do 25 dneh po porodu (Čengić in sod., 2012). Leslie (1983) za molznice ugotavlja, da je po takojšnji odstavitvi in začetku strojne molže involucija končana po 25 do 30 dneh po porodu; razlog za to so verjetno pogosti valovi oksitocina, ki nastanejo med molžo in bolj intenzivno krčenje miometrija. V splošnem velja, da se maternica v normalno velikost povrne v 30 do 40 dneh, cerviks pa 40 do 50 dni po porodu, če involucija poteka normalno (Podpečan, 2005).

Na število dni, potrebnih za involucijo, vplivajo številni dejavniki, kot so težke telitve, poškodbe rodil, zaostala posteljica, abortus, izpad maternice in bakterijske infekcije. Vsi ti dejavniki lahko vplivajo na občutno podaljšanje involucijskega procesa (Hussain in Daniel, 1991; Kamimura in sod., 1993). Na involucijo vpliva tudi število laktacij; starejše krave, ki so večkrat telile potrebujejo več časa kot prvesnice (Rajamehendran in Taylor, 1990). Hitrost involucije je odvisna tudi od sezone oz. letnega časa (trajanje glede na letni čas: pomlad 47 dni, poletje 42 dni, jesen 44 dni in zima 51 dni), podnebnih razmer, opremljenosti hleva oz. razmer, kjer so živali nameščene (več časa za involucijo beležijo v vezani reji) in kakovosti prehrane (Čengić in sod, 2012). Na involucijo maternice zaviralno vpliva tudi hipokalcemija, ki se pojavi po telitvi, ker se potrebe po kalciju enormno povečajo (krave lahko v prvih 24 urah v 10 litrih kolostruma izločijo do 23 g kalcija, v krvi pa ga je samo 3 g). V blažjih (subkliničnih) oblikah hipokalcemija vpliva na slabši tonus prečno progaste in gladke mišičnine, zato je večja verjetnost, da pride do izpada maternice, RS, slabše involucije maternice, endometritisa, mastitisa in zmanjšane motorike prebavil (Goff, 2003). Zaradi slabše motorike prebavil se zmanjša zauživanje suhe snovi, kar poslabša NEB in lahko vodi tudi v ketozo ali v sindrom zamaščenih jeter. Povečana koncentracija ketonskih teles in NEFA v krvi še dodatno zmanjšuje apetit (Grummer in sod, 2004).

2.7 FOLIKULARNA TEKOČINA

Folikularna tekočina (FF) igra pomembno vlogo pri avtokrini in parakrini regulaciji ter je pomembna z vidika fizioloških, biokemičnih in presnovnih procesov zorenja jajčnih celic ter

procesa ovulacije (Tabatabaei in sod., 2011). To tekočino sestavljajo lokalno proizvedene snovi v foliklu, ki so povezane s presnovno aktivnostjo folikularnih celic, in deloma tudi eksudat seruma. FF zagotavlja ustrezno mikrookolje za razvoj, rast in zorenje jajčnih celic ter je ključnega pomena za vzdrževanje plodnosti pri samicah (Kalmath in sod, 2007; Gosden in sod., 1988). FF ščiti jajčece pred dejavniki, ki povzročajo prezgodnjo ponovno mejozo, varuje oocite pred proteolitičnimi procesi, pospešuje njihovo iztiskanje med ovulacijo in povečuje gibljivost semenčic, njihovo gibljivost ter akrosomalno reakcijo. Nekatere biokemične značilnosti FF lahko igrajo ključno vlogo pri določanju kakovosti jajčec in posledično sposobnosti za dosego oploditve ter razvoja zarodka. Analiza komponent FF lahko tudi zagotovi informacije o presnovnih spremembah v krvnem serumu, saj se te biokemične spremembe odražajo v sestavi FF. Zato lahko pričakujemo različno biokemično sestavo FF v različnih velikostih foliklov. Presnovne spremembe v krvnem serumu se lahko tako odražajo v biokemični sestavi FF (Abd Ellah in sod., 2010; Armstrong in sod., 2003).

Pravilno delovanje jajčnikov je ključnega pomena za ohranitev plodnosti in splošnega zdravja živali. Funkcija jajčnikov pa je odvisna od normalnega razvoja foliklov v jajčnikih (Sajal in sod., 2011). Dokazano je, da poleg ogrožanja nastajanja foliklov, hormonskega izločanja, endometrija in embrionalnih funkcij, vročinski stres tudi izrazito zmanjšuje razvojno sposobnost jajčec. Dovzetnost jajčeca za povišano temperaturo lahko zaznamo med obdobjem germinalnega vezikla in med zorenjem jajčeca. *In vivo* (vročinski stres) in *in vitro* (toplotni šok) rezultati kažejo, da izpostavljenost govejih jajčnih celic povišani temperaturi vpliva na dogodke, potrebne za uspešno zorenje jajčec, oploditev in predimplantacijski razvoj zarodka. Vročinski stres zmanjša funkcijo jajčnih celic; pride do niza celičnih sprememb, ki vplivajo na jedro in citoplazmatske organele v jajčnih celicah govedi. Toda termo zaščitne molekule, kot so rastni faktorji in inhibitorji apoptoze, do neke mere preprečujejo vročinske poškodbe oocite in njene razvojne sposobnosti. Zato je lahko identifikacija termo zaščitnih molekul alternativa za moduliranje učinkov povišane temperature v reprodukcijskih funkcijah (Badinga in sod., 1993).

Omejeni podatki modelov mišk kažejo, da imamo več antioksidantivnih encimov, ki varujejo celice pred ROS in lahko igrajo pomembno vlogo pri folikularnem razvoju in preživetju (Patrick in sod., 2012; Abd Hamid in sod., 2011). Ker dosedanje študije kažejo, da ima oksidativni stres lahko pomemben negativni vpliv na plodnost samic in zdravje gamet, se lahko prehransko ali terapevtsko posredovanje izkaže za učinkovito strategijo za preventivo plodnostnih motenj. FF

je pomembno okolje za razvoj jajčnih celic, vendar je trenutno poznavanje njene *in vivo* ravni oksidantov in antioksidantov še vedno omejeno (Ho in sod., 1997; Ho in sod., 2004; Pretsch, 1999; Paula-Lopes in sod., 2012).

2.8 EMBRIOTRANSFER OZ. PRENOS ZARODKOV

V govedoreji se kot način reprodukcije vse bolj uveljavlja embriotransfer oz. ET, metoda prenosa zarodkov iz ene krave v drugo, ki omogoča večje število oploditev v primerjavi z naravno oploditvijo. Pri kravah nizke proizvodnje, slabega eksterierja, ki prenašajo slabe lastnosti na potomke, pa lahko pridobimo teleta vrhunskih genskih lastnosti in proizvodnje (Hussein, 2014). Pomembno je, da je prejemnica zarodka, torej telica ali prvesnica, popolnoma zdrava v reprodukcijskem smislu, da se po ovulaciji na istem jajčniku razvije kakovostno in pravilno CL. Prejemnico se pred prenosom zarodka pripravi z aplikacijo mineralov in vitaminov, da se poveča verjetnost uspešnosti postopka (Sartori in sod., 2004). Na uspešnost reprodukcije s pomočjo ET vplivajo številni dejavniki: kakovost zarodka, zdravstveno in prehransko stanje živali ter različni dejavniki v okolju. S prehranskega vidika je pomembna pravilna oskrba živali z energijo in beljakovinami, zadostna količina makroelementov, predvsem kalija, fosforja in kalcija, mikroelementov Se, mangana, bakra, joda in kobalta ter zadostna količina vitaminov A, D, E in karotenov, saj to povečuje možnost preživetja zarodka in ohranjanje brejosti. Na uspešnost ET imajo velik vpliv tudi okoljske oz. klimatske razmere, kot sta npr. poletna vročina in vročinski stres, ki smo ga že omenili (Hussein, 2014).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 ZASNOVA RAZISKAVE IN POGOJI

Za opravljanje raziskave smo izbrali zasebno kmetijo Šmigoc, Podlehnik 24, Podlehnik. Raziskava za potrebe doktorskega dela je bila opravljena na dveh skupinah živali, ki smo jih naključno razdelili v poskusno in kontrolno skupino, in sicer je bilo v raziskavo vključenih:

- 34 krav črno-bele pasme v tretji laktaciji,
- 34 telic črno-bele pasme.

Za delo z živalmi je Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin izdala pisno dovoljenje (št. dovoljenja U34401-19/2016/8); celotno delo je bilo izvedeno v skladu z etičnimi standardi in načeli.

3.2 REJA ŽIVALI

Na kmetiji redijo cca. 350 živali, od tega približno 170 krav v proizvodni čredi (krave molznice), okrog 80 telic; ostalo je mlada živina. Vse živali so nastanjene v istem hlevu; telice so ločene od matične črede, nastanjene v ločenih boksih. V proizvodno čredo so vključene v brejosti od sedem do osem mesecev. Lega kmetije je nižinska; primarna dejavnost je tržna prireja mleka. Povprečna mlečnost krav je 8700 do 9000 l mleka (povprečna vsebnost mlečne maščobe 4,4 %; povprečna vsebnost beljakovin 3,7 %).

Živali se redijo v načinu proste reje, v odprtem hlevu (v hlevu je podobna klima kot zunaj, brez prepiha). Hlev je razdeljen na dva dela, ločen del s talnimi rešetkami in del z individualnimi ležalnimi boksi. V poletnem času imajo živali možnost prostega izpusta na pašnik. Molža je robotsko vodena. Nekaj dni pred predvidenim porodom so krave ločene od matične črede v t. i. porodnišnico. Tla se čistijo s pomočjo robotskega čistilca. Vse živali so označene z ušesno identifikacijsko številko. Poleg tega imajo še pametno ovratnico (sledilnik/transponder), preko katere spremljajo, računalniško vodijo in obdelujejo podatke o gibanju živali, količini in kakovosti mleka, številu molž, plodnosti, prehrani in zdravju posamezne živali. Pojatve odkrivajo računalniško preko transponderjev s pedometri za spremljanja gibanja živali.

Krave molznice in telice dobijo osnovni obrok na krmilni mizi, poleg tega še močna krmila na računalniško vodenem krmnem avtomatu (odmerjanje količine in sestave obroka preko

pametne ovratnice). Osnovni obrok je vse leto enak, sestavljen iz sena, travne in koruzne silaže in ga živali dobijo dvakrat dnevno. Glede na proizvodnjo in fazo laktacije živali na krmnem avtomatu dobijo še beljakovinski koncentrat, grobo mleto koruzno zrnje in vitaminsko-mineralno mešanico.

Telice osemenjujejo v starosti 16 do 17 mesecev oz. pri telesni teži 350 do 400 kg. Prvo osemenitev po telitvi izvajajo po 40. dnevu po porodu; za uspešno obrejitev je v povprečju potrebnih 1,6 osemenitev; DMT znaša 335-405 dni (povprečje 353).

3.3 IZBIRA ŽIVALI – VKLJUČITVENI IN IZKLJUČITVENI KRITERIJI

3.3.1 Krave v tretji laktaciji

Za preverjanje prvih štirih hipotez smo deset mesecev pred načrtovano izvedbo raziskave (september 2017) izbrali 38 krav, pri katerih smo s kliničnim pregledom izključili reprodukcijske bolezni in potrdili, da so v dobri telesni kondiciji. Vseh 38 krav smo osemenili v drugi polovici oktobra oz. v prvi polovici novembra 2017. Za opravljanje raziskave smo izbrali krave, ki so se v drugi laktaciji izkazale z največjo mlečnostjo oz. živali z najvišjo pričakovano tretjo laktacijo ter s tem najvišjo obremenitvijo v življenjskem okolju. Kasneje smo iz raziskave izločili štiri krave, ker po osemenitvi niso ostale breje. Preostalih 34 smo naključno razvrstili v dve skupini, 16 v tretirano in 18 v netrenirano oz. kontrolno skupino; povprečna starost krav v obeh skupinah je bila 48 mesecev, sicer pa se je starost vseh krav, vključenih v raziskavo, gibala med 46 in 50 mesecev.

3.3.2 Telice prejemnice zarodkov

Za preverjanje 4. hipoteze je bila opravljena raziskava na 34 telicah črno-bele pasme, ki smo jih pred vključitvijo v raziskavo veterinarsko pregledali ter potrdili, da so bile vse zdrave. Naključno smo jih razvrstili v dve skupini, 17 v tretirano in 17 v netretirano oz. kontrolno skupino; povprečna starost telic v obeh skupinah je bila 18 mesecev, sicer pa se je starost vseh telic vključenih v raziskavo gibala med 17 in 20 mesecev.

3.4 POGOJI

Vse živali vključene v raziskavo so bile v času izvedbe raziskave nameščene v istem hlevu ter tako izpostavljene enakim klimatskim pogojem. V porodnišnici, proizvodnem hlevu in zunaj hleva so bile za obdobje 31 dni postavljene naprave, ki so merile temperaturo zraka, relativno

vlažnost zraka (RV%) in ogljikov dioksid (mg/L CO_2) ter vrednosti sproti beležile (podatki v prilogi). Meritve so se izvajale in beležile trikrat dnevno, in sicer ob 10 h, 14 h in 18 h. Merilce je postavil Inštitut za higieno okolja in živali z etologijo Veterinarske fakultete. V tabeli 1 so prikazane minimalne, maksimalne in povprečne vrednosti temperature zraka, relativne vlažnosti in ogljikovega dioksida v času izvajanja raziskave.

Tabela 1: Minimalne, maksimalne in povprečne vrednosti temperature zraka, relativne vlažnosti in ogljikovega dioksida v času izvajanja raziskave.
Table 1: Minimum, maximum and average values of air temperature, relative humidity and carbon dioxide during the research period.

ČAS		10h			13h			18h		
		Min	Max	M	Min	Max	M	Min	Max	M
Poleti	Tem. (°C)	17,3	31,1	22,1	18,7	37,2	24,5	17,7	35,2	23,5
	RV %	52,6	94,6	76,1	60,7	90,2	72,1	56,8	89,8	73,7
	CO_2 (mg/L)	459	770	581	450	749	560	431	700	557

Opombe: Min – minimalna izmerjena vrednost; Max – maksimalna izmerjena vrednost, M – povprečna izmerjena vrednost

Maksimalna zunanja temperatura je bila 37,2 °C, minimalna 17,3 °C; povprečna zunanja temperatura ob 10 h je bila 22,1 °C, ob 14 h 24,5 °C ter ob 18 h 23,5 °C.

Vse živali so v času izvedbe raziskave dobivale enak osnovni obrok ter močna krmila v enaki količini. Osnovni obrok je bil sestavljen iz sena, koruzne in travne silaže ter z dodatkom koncentratov. Sestavine obroka so navedene v tabeli 2; vsebnost hranljivih snovi je navedena v tabeli 3. Na računalniško vodenem krmilniku so krave prejele še močna krmila, ob posameznem krmljenju 2 kilograma.

Tabela 2: Sestava obroka.
Table 2: Composition of the meal.

Surovina	**Količina**
Koruzna silaža	24,3 kg
Seno	1,2 kg
Pšenična slama	0,6 kg
Travna silaža	19,5 kg
Žitni DDGS (Distiller's dried grains with solubles)	0,75 kg
Žitmix	2 kg
K-mix-41 moka	3,0 kg
Soda bikarbona	0,06 kg

Tabela 3: Vsebnost hranljivih snovi v obroku.
Table 3: Nutrient content of the diet.

Hranljiva snov	**Količina**
Suha snov (SS)	451,23 g/kg
Selen	0,235mg/kgSS
Vitamin E	36,2 mg/kgSS
Surove beljakovine	142, 74 g/kgSS
Prebavljive surove beljakovine	71,78 g/kgSS
Škrob	226, 18 g/kgSS
Presnovljive beljakovine PBN	62,14 g/kgSS
Nerazgradljive surove beljakovine	54,27 g/kgSS
Surove vlaknine	169, 23 g/kgSS
Sladkor	47,02 g/kgSS
Presnovljive beljakovine PBE	59,73 g/kgSS

Vsebnost Se v osnovnem obroku je bila 0,235 mg/kg suhe snovi, vsebnost vit. E pa 36,2 mg/kg suhe snovi. Na računalniško vodenem krmilniku so krave prejele še močna krmila, ob posameznem krmljenju 1,5 kilograma krmil z vsebnostjo 0,355 mg/kg Se ter 26,2 mg/kg vit. E. S tem so bile pokrite osnovne potrebe živali po Se in vit. E.

3.5 TRETIRANJE ŽIVALI

3.5.1 Krave

Poskusni skupini krav smo trikrat parenteralno aplicirali:

- kombinacijo vitaminov AD$_3$E (Krka; vitamin A, holekalciferol-vitamin D in tokoferolacetat-vit. E), ki ga pri živalih uporabljamo za spodbujanje rasti in proizvodnosti, zviševanje odpornosti proti okužbam in za izboljšanje splošnega stanja živali. 1 ml emulzije AD$_3$E za injiciranje vsebuje 50.000 IE vitamina A, 25.000 IE holekalciferola (vitamin D) ter 20 mg tokoferolacetata (vit. E);
- selen – TOKOSELEN emulzijo za injiciranje (Genera), ki ga večinoma uporabljamo za preprečevanje in zdravljenje sistemskih miopatij ter pri motnjah v reprodukciji in razvoju plodov pri vseh domačih živalih. 1 ml emulzije za injiciranje vsebuje 150 mg tokoferol acetata (vit. E, Tocopherylis acetas) in 0,5 mg Se v obliki natrijevega selenita (Natrii selenis).

Tretiranje je potekalo:

- 7 dni pred predvidenim porodom (i/m):
    - 35 ml vit. AD_3E (700 mg vit. E),
    - 20 ml Tokoselena (3000 mg vit. E, 10 mg Se);
- ob porodu (s/c):
    - 35 ml vit. AD_3E (700 mg vit. E),
    - 20 ml Tokoselena (3000 mg vit. E, 10 mg Se);
- 14 dni po porodu (s/c):
    - 35 ml vit. AD_3E (700 mg vit. E),
    - 20 ml Tokoselena (3000 mg vit. E, 10 mg Se).

Slika 1: Zdravila, uporabljena v raziskavi.
Figure 1: The drug used in the present study.

3.5.2 Telice prejemnice zarodkov

Telicam, prejemnicam smo sinhronizirali estrus in jih naključno razdelili v tretirano in kontrolno skupino. V vsaki skupini je bilo 17 telic. Za transfer smo uporabili globoko zamrznjene zarodke črno-bele pasme. Poskusni skupini telic smo dvakrat, in sicer 14 in 7 dni pred transferjem, parenteralno aplicirali Se (TOKOSELEN, GENERA) in kombinacijo vitaminov AD_3E (Vitamin AD_3E Krka). V obeh tretiranjih so telice prejele 35 ml vit. AD_3E (700 mg vit. E) i/m in 20 ml Tokoselena (3000 mg vit. E, 10 mg Se) i/m. Vnos zarodkov smo pri obeh skupinah telic opravili isti dan. Pred začetkom vnosa zarodkov smo izvedli ultrazvočni pregled telic, da smo izključili kakršnekoli bolezni, ki bi lahko vplivale na uspešnost prenosa, in opravili analizo krvi. Uspešna implantacija je z UZ potrjena brejost 30. dan in 60. dan brejosti.

3.6 ODVZEM IN PRIPRAVA VZORCEV KRVI IN FOLIKULARNE TEKOČINE

3.6.1 Krave

Kri za določanje plazemske koncentracije aktivnosti GPX, aktivnosti SOD, skupne antioksidantne kapacitete z reagenčnim kompletom TAS, BHB, NEFA, Se in vit. E smo odvzeli v 5 ml epruvete z antikoagulantom in jo takoj po odvzemu centrifugirali 15 minut pri 1500 x g na 4 °C. Po končanem centrifugiranju smo plazmo ločili in takoj zamrznili na –196 °C do analize. Vzorce krvi smo odvzeli štirikrat, in sicer en teden pred predvideno telitvijo, ob porodu, 14 dni po porodu ter 4 tedne po porodu ob punkciji foliklov.

28 dni po porodu smo s pomočjo transvaginalne ultrazvočne punkcijske sonde punktirali folikle in tako pridobili FF. Uporabili smo ultrazvočni aparat Aloka, model SSD 550, s 5 MHz linearno transrektalno sondo. FF za določanje koncentracije TAS, Se in vit. E smo odvzeli v 5 ml epruvete z antikoagulantom in jo takoj po odvzemu centrifugirali 15 minut pri 1500 x g na 4 °C. Po končanem centrifugiranju smo ločili zgornji medij (supernatant) in ga takoj zamrznili na –196 °C do analize.

Slika 2: Transvaginalna ultrazvočna punkcijska sonda in punkcijska črpalka.
Figure 2: Transvaginal ultrasound puncture probe and puncture pump.

Slika 3: Prikaz postopka zamrzovanja.
Figure 3: Demonstration of the freezing process.

3.6.2 Telice prejemnice zarodkov

Pred vnosom zarodkov smo obema skupinama telic odvzeli kri za določanje plazemske koncentracije ROS, NEFA, Se in vit. E. Kri smo odvzeli v 5 ml epruvete z antikoagulantom in jih takoj po odvzemu centrifugirali 15 minut pri 1500 x g na 4 °C. Po končanem centrifugiranju smo plazmo ločili in takoj zamrznili na –196 °C do analize.

3.7 SPREMLJANJE SPREMEMB NA RODILIH V POPORODNEM OBDOBJU

Po porodu smo s pomočjo UZ (uporabljali smo ultrazvočni aparat Aloka, model SSD 550 s 5 MHz linearno transrektalno sondo) pri vseh kravah spremljali involucijo maternice in spremembe na jajčnikih do prve pojatve (ovulacije). Prvi UZ pregled smo opravili 7. dan po porodu; nato so bili pregledi v razmaku sedem dni do potrjene brejosti za vsako izmed krav, vključenih v raziskavo. Ultrazvočni pregled je obsegal pregled materničnega vratu, maternice (telo in oba rogova) in določitev položaja, velikosti in simetrije rogov ter jajčnikov, pri katerih smo določili njihov položaj, velikost in prisotnost tvorb na jajčnikih.

Spremljali smo patološka dogajanja na rodilih in jajčnikih: zaostala posteljica (retencija sekundin), motnje v involuciji maternice, endometritis (brez retencije sekundin), tihe pojatve (subestrus) in izostajanje pojatev (anestrus). Involucijo maternice smo spremljali od sedmega dne po porodu v sedemdnevnih presledkih, z merjenjem premera materničnih rogov, določitvijo gravidnega roga, evidentiranjem količine lohijalne vsebine in s količino vaginalnega izcedka. Involucijo smo ocenili kot zaključeno, ko se premer rogov pri dveh zaporednih pregledih ni več spremenil. Pri endometritisu (brez retencije sekundin) smo ocenjevali prisotnost intrauterine

tekočine in premer maternice; definirali smo ga kot hiperemijo in edem sluznice z akumulacijo različnih količin tekočine, ki v lumnu ostaja 10 dni ali več. Spremljali smo tudi pojavnost folikularnih in luteinskih cist. Cistične degeneracije jajčnikov smo določili ob prisotnosti anovulatornega folikla s premerom več kot 17 mm (22 mm), ki je perzistiral več kot šest dni (10 dni), ko ni bilo prisotnega funkcionalnega rumenega telesa ter ob prisotnosti nenormalnih znakov pojatve (anestrus, nimfomanija, nenormalna cikličnost).

Izvrednotili smo analizo plodnosti oz. določili reprodukcijske parametre: SI, SP, PP in DMT ter rezultate primerjali med tretirano in kontrolno skupino.

Vsa dogajanja pri ginekoloških pregledih smo zabeležili na posebnih evidenčnih kartonih za vsako žival posebej in priložili ultrazvočne slike.

Slika 4: Ultrazvočni aparat Aloka, model SSD 550 s 5 MHz linearno transrektalno sondo.
Figure 4: Ultrasound device Aloka, model SSD 550 with a 5 MHz linear transrectal probe.

3.8 LABORATORIJSKE PREISKAVE

Laboratorijsko delo in analize so bile izvedene v laboratorijih na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani.

3.8.1 Določanja koncentracije selena in vitamina E

Analize določanja koncentracije Se in vit. E v krvni plazmi in FF smo opravili na Inštitutu za varno hrano, krmo in okolje. Koncentracijo Se v krvni plazmi smo določili z aparaturo ICP z masnim spektrometrom (Varian, 820-MS, Mulgrave, Australia), koncentracije vit. E pa s HPLC sistemom (Waters Alliance 2690, Milford, MA, USA).

Slika 5: HPLC – Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti s fluorescenčnim detektorjem.
Figure 5: HPLC – High-performance liquid chromatography with a fluorescence detector.

Slika 6: Masni spektrometer (Varian 820-MS).
Figure 6: Mass spectrometer (Varian 820-MS).

3.8.2 Določanje skupne antioksidantne kapacitete z reagenčnim kompletom TAS (TAC)

TAS smo določali spektrofotometrično (600 nm) z reagenčnim kompletom TAS na avtomatskem biokemijskem analizatorju (RX Daytona, Randox, VB). Metoda določanja je posredna, saj v reakciji nastale proste radikale (ABTS -2.2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-

sulfonat)) reducirajo v vzorcu prisotni antioksidanti, kar merimo z znižanjem absorbance pri 600 nm po treh minutah. Rezultate smo izrazili kot mmol/l Trolox ekvivalentov (standard, 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kislina – derivat vit. E).

3.8.3 Določanje aktivnosti glutation peroksidaze – GPX

Aktivnost GPX v hemolizatu polne krvi smo določali spektrofotometrično (340 nm) z avtomatskim biokemijskim analizatorjem (RX Daytona, Randox, VB). Uporabili smo komercialno dostopen reagenčni komplet Ransel-GPX, katerega osnova je posredna metoda določanja aktivnosti GPX. GPX katalizira oksidacijo glutationa s sintetičnim kumen hidroperoksidom; pri reakciji nastali oksidirani glutation se nato v indikatorski reakciji z glutation reduktazo in ob prisotnosti nikotinamid adenin dinukleotid fosfata prevede v glutation in nikotinamid adenin dinukleotid fosfata. Hitrost oksidacije nikotinamid adenin dinukleotid fosfata, ki jo merimo kot padec absorbance pri 340 nm, je proporcionalna aktivnosti GPX v vzorcu. Aktivnost GPX smo izrazili v enotah na gram hemoglobina (U/g Hgb).

3.8.4 Določanje aktivnosti superoksid dismutaze - SOD

Aktivnost SOD v hemolizatu eritrocitov smo določali spektrofotometrično pri 550 nm z reagenčnim kompletom na avtomatskem biokemijskem analizatorju (RX Daytona, Randox, VB). V uporabljeni metodi je sistem za proizvodnjo superoksidnih radikalov pripravljen iz ksantina in ksantin oksidaze. Indikatorska spojina je 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolijev klorid (INT), ki reagira s superoksidnim radikalom v barvilo formazan. Aktivnost SOD smo merili s stopnjo inhibicije te reakcije. Iz umeritvene krivulje odstotka inhibicije standardnih raztopin in z desetiškim logaritmom koncentracije (U/ml) smo določili aktivnosti SOD v neznanih vzorcih. Aktivnost SOD smo izrazili v enotah na gram hemoglobina (U/gHgb).

Slika 7: RX Daytona (RANDOX, VB) avtomatski biokemijski analizator.
Figure 7: RX Daytona (RANDOX, UK) automatic biochemistry analyzer.

Za določanje presnovnega statusa živali smo izbrali parametra NEFA in BHB, ki po navedbah nekaterih avtorjev (Schilllo, 1992; Vanholder in sod., 2005) opredeljujeta NEB. Koncentracijo NEFA in BHB smo določali z biokemijskimi preiskavami krvnega seruma (RX Daytona, Randox, VB).

3.9 STATISTIČNE ANALIZE

Primerjali smo koncentracije antioksidantov, GPX, SOD, TAS, Se in vit. E v krvni plazmi ter FF med tretiranimi in netretiranimi kravami oz. telicami (ET, 5. hipoteza). S Shapiro-Wilk testom smo ugotavljali normalnost porazdelitve dobljenih rezultatov; izračunali smo srednjo vrednost, standardno deviacijo (SD) in 95 % interval zaupanja za posamezne parametre. Statistično pomembne razlike med posameznimi skupinami smo v primeru normalne porazdelitve primerjali s parametričnim t-testom. Ko porazdelitev ni bila normalna, smo uporabili neparametrični Mann-Whitneyev test. Določali smo p-vrednosti ali stopnjo značilnosti, ki jo uporabljamo pri preverjanju domnev oz. hipotez o različnosti med dvema vzorcema. Rezultate smo opredelili kot statistično značilne pri $p \leq 0,05$. Za preverjanje, ali med izmerjenimi parametri obstajajo linearne povezanosti, smo izračunali koeficiente korelacije (Pearsonov koeficient korelacije). Korelacije smo opredelili kot statistično značilne pri $p \leq 0,05$. Za analizo podatkov smo uporabili statistični programski paket IBM SPSS Statistics 24.

4 REZULTATI

4.1 KONCENTRACIJA VIT. E IN Se TER VREDNOSTI PARAMETROV OKSIDATIVNEGA IN METABOLNEGA STRESA

V tabeli 4 so predstavljene povprečne vrednosti in standardni odkloni indikatorjev NEB (NEFA in BHB), vrednosti parametrov oksidativnega stresa (SOD, GPX, TAS) ter koncentracije vit. E in Se v krvni plazmi (ločeno za kontrolno in tretirano skupino krav) ter statistična pomembnost razlike v merjenih parametrih med skupinama. Primerjava navedenih parametrov je prikazana za štiri različne vzorce krvne plazme, ki smo jih odvzeli v intervalu od sedem dni pred porodom do osemindvajset dni po porodu. Na koncu tabele 4 so prikazani še povprečne vrednosti in standardni odkloni vrednosti TAS ter koncentracije vit. E in Se v FF, ki smo jo odvzeli osemindvajset dni po porodu, ter izračun statistične pomembnosti razlike med kontrolno in tretirano skupino.

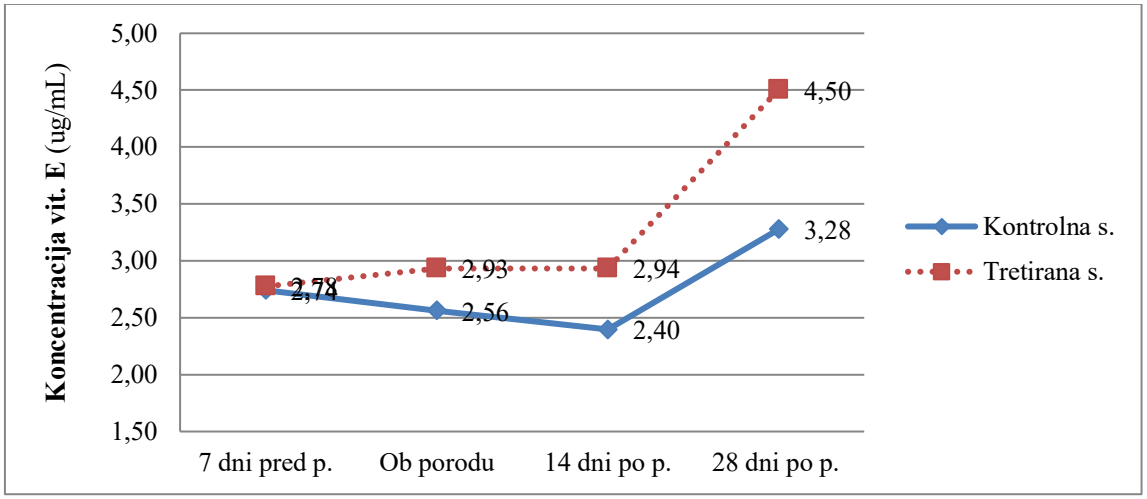
Pri prvem vzorčenju pred prvim tretiranjem med skupinama krav molznic ni bilo statistično pomembnih razlik v katerem koli izmed merjenih parametrov (skupine so bile izenačene). Pri drugem vzorčenju so bile vrednosti/koncentracije vit. E in Se ter aktivnosti GPX in SOD višje v tretirani skupini. Učinek tretiranja je najmočnejši pri tretjem vzorčenju (14 dni po porodu) oz. po drugem tretiranju, kjer so razlike med skupinama statistično pomembne pri vseh izmerjenih parametrih. Ob četrtem vzorčenju štiri tedne po porodu oz. po tretjem tretiranju je učinek tretiranja še vedno viden; razlika ni bila več statistično pomembna samo na parametrih energijske bilance (NEFA in BHB). Pri FF se je kot statistično značilna pokazala razlika med koncentracijami vit. E in Se med skupinama, ne pa v vrednosti TAS.

Tabela 4: Primerjava vrednosti indikatorjev negativne energijske bilance (NEFA in BHB), vrednosti parametrov oksidativnega stresa (SOD, GPX, TAS) ter koncentracije vit. E in Se v krvni plazmi med kontrolno in tretirano skupino krav ter statistična pomembnost razlike pred začetkom tretiranja in po tretjem tretiranju.
Table 4: Comparison of values of indicators of negative energy balance (NEFA and BHB), values of oxidative stress parameters (SOD, GPX, TAS), and concentration of vit. E and Se in the blood plasma between the control and treated groups of cows and the statistical significance of the difference before the start of the treatment and after the third treatment.

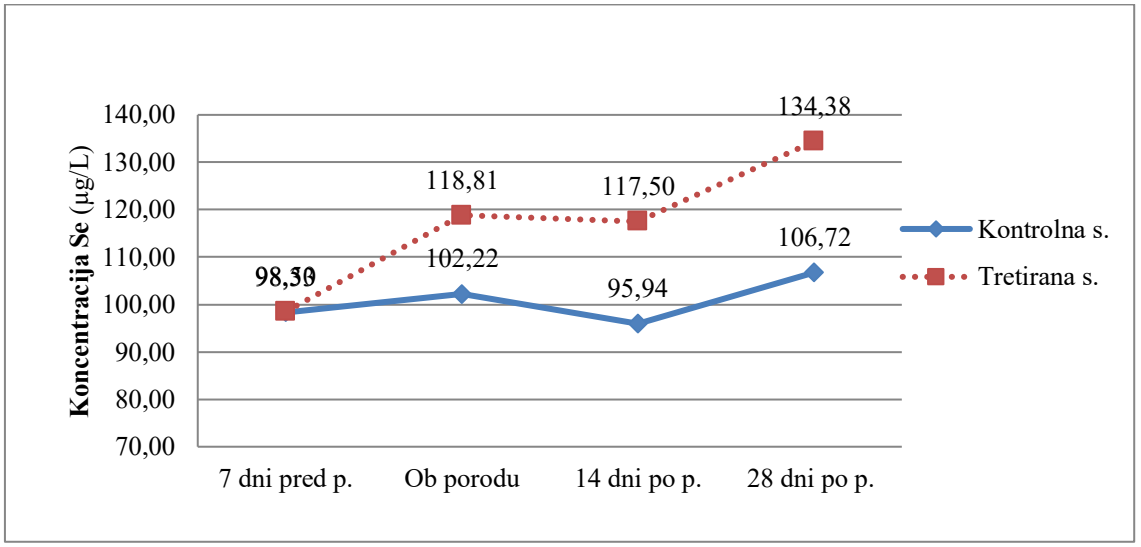
		Kontrolna skupina (N=18)		Tretirana skupina (N=16)		
		M	SD	M	SD	*p*
1. VZOREC – 7 dni pred predvideno telitvijo in pred prvim tretiranjem	TAS (mmol/L)	1,32	0,17	1,34	0,09	*0,813*
	Vit. E (µg/mL)	2,74	0,64	2,78	0,59	*0,876*
	Selen (µg/L)	98,33	16,13	98,50	14,30	*0,975*
	NEFA (mmol/L)	0,36	0,21	0,33	0,15	*0,653*
	BHB (mmol/L)	0,72	0,25	0,67	0,17	*0,541*
	SOD (U/g Hgb)	2902,61	328,19	3171,38	384,57	*0,351*
	GPX (U/g Hgb)	477,06	50,05	500,19	62,98	*0,242*
2. VZOREC – ob porodu in pred drugim tretiranjem	TAS (mmol/L)	1,34	0,26	1,36	0,14	*0,779*
	Vit. E (µg/mL)	2,56	0,44	2,93	0,59	***0,044***
	Selen (µg/L)	102,22	15,67	118,81	10,51	***0,001***
	NEFA (mmol/L)	0,44	0,28	0,40	0,30	*0,717*
	BHB (mmol/L)	0,77	0,40	0,74	0,60	*0,864*
	SOD (U/g Hgb)	2952,61	328,19	3221,38	384,57	***0,035***
	GPX (U/g Hgb)	426,33	39,34	509,31	62,84	***0,000***
3. VZOREC – 14 dni po porodu in pred tretjim tretiranjem	TAS (mmol/L)	1,37	0,64	1,56	0,38	***0,043***
	Vit. E (µg/mL)	2,40	0,69	2,94	0,59	***0,021***
	Selen (µg/L)	95,94	8,52	117,50	16,11	***0,005***
	NEFA (mmol/L)	0,59	0,33	0,43	0,31	***0,049***
	BHB (mmol/L)	0,84	0,43	0,76	0,23	***0,046***
	SOD (U/g Hgb)	3061,17	460,05	3371,94	473,25	***0,021***
	GPX (U/g Hgb)	487,11	70,63	585,25	47,82	***0,042***
4. VZOREC – 28 dni po porodu	TAS (mmol/L)	1,26	0,45	1,53	0,11	***0,004***
	Vit. E (µg/mL)	3,28	0,74	4,50	0,94	***0,003***
	Selen (µg/L)	106,72	14,61	134,38	13,07	***0,006***
	NEFA (mmol/L)	0,39	0,22	0,21	0,15	*0,051*
	BHB (mmol/L)	0,78	0,42	0,62	0,20	*0,075*
	SOD (U/g Hgb)	3207,44	525,97	3606,31	285,15	***0,011***
	GPX (U/g Hgb)	505,33	67,14	601,13	37,21	***0,032***
Folikularna tekočina – 28 dni po porodu	TAS (mmol/L)	1,59	0,41	1,79	0,48	*0,206*
	Vit. E (µg/mL)	2,14	0,64	2,72	0,93	***0,040***
	Selen (µg/L)	138,72	16,67	153,06	23,53	***0,047***

Opombe: N – število živali; M – srednja vrednost; SD – standardni odklon; *p* = statistična pomembnost razlike med skupinama.

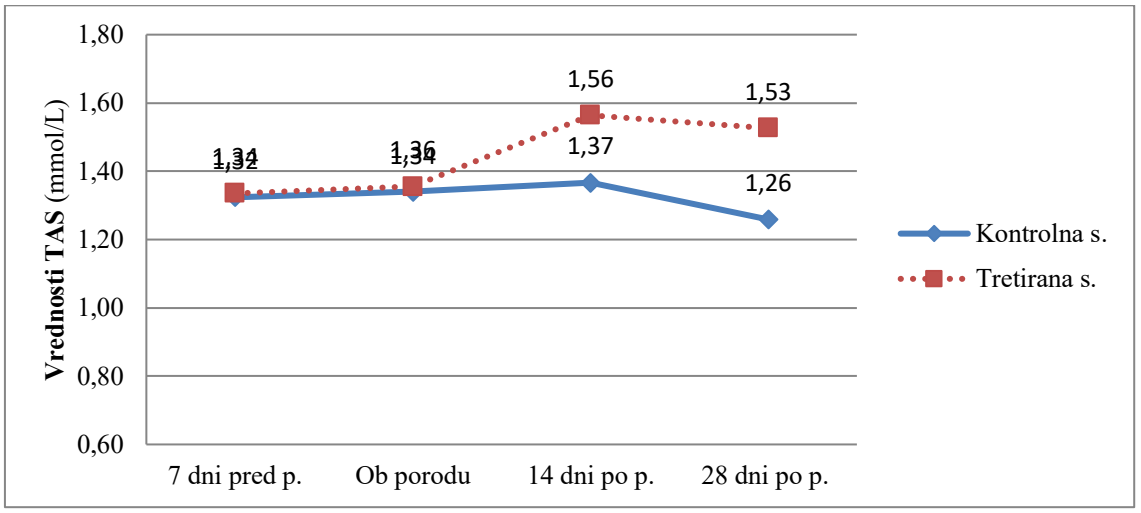
Na slikah od 8 do 14 so grafično predstavljene krivulje koncentracij vit. E, Se, TAS, SOD, GPX, NEFA in BHB v krvni plazmi v odvisnosti od časa pred oz. po porodu za tretirano in kontrolno skupino krav.



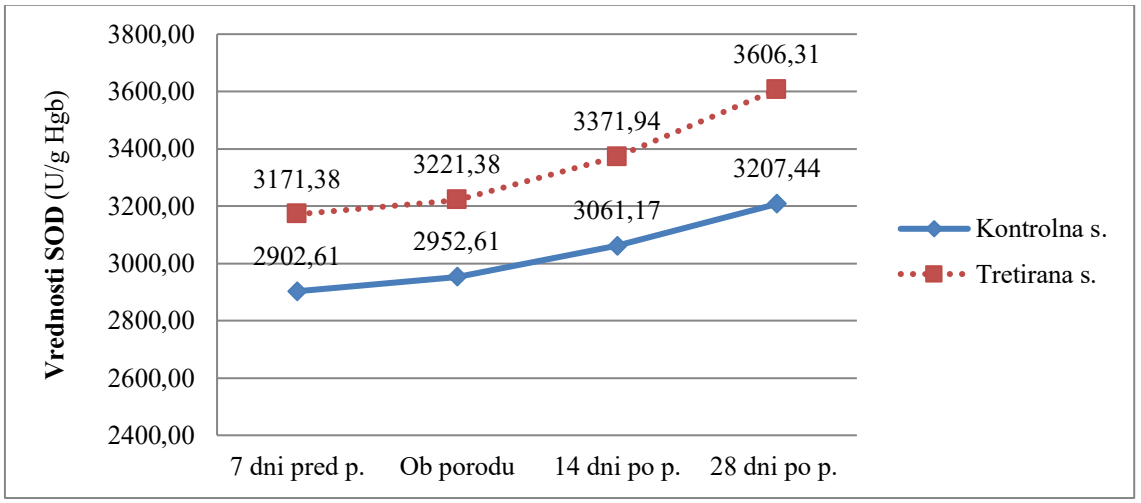
Slika 8: Prikaz koncentracije vit. E v krvni plazmi v odvisnosti od časa pred oz. po porodu za tretirano in kontrolno skupino krav.
Figure 8: Display of the concentration of vit. E in blood plasma as a function of time before and after parturition for the treated and control group of cows.



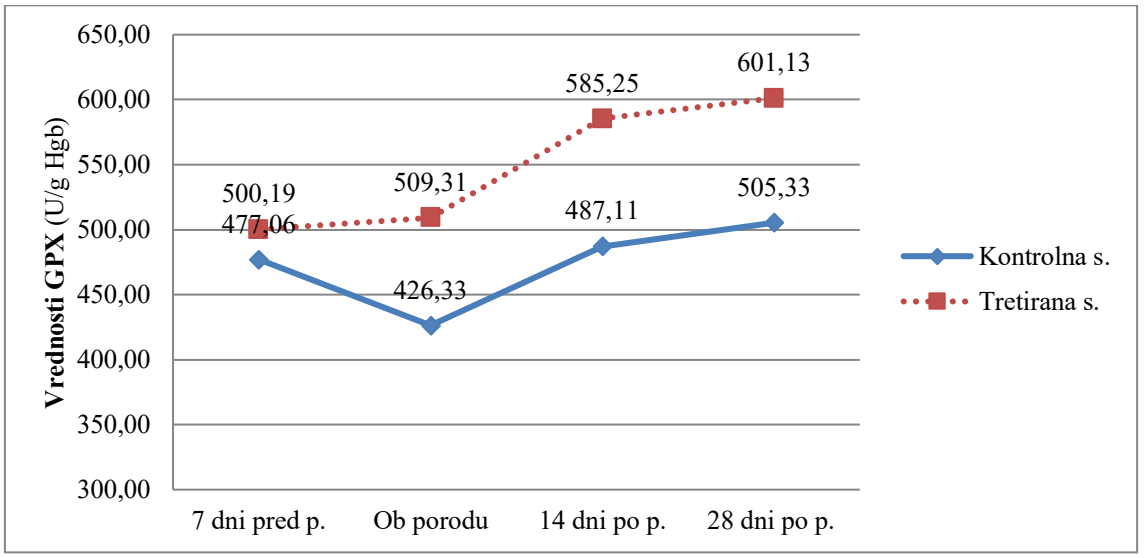
Slika 9: Prikaz koncentracije Se v krvni plazmi v odvisnosti od časa pred oz. po porodu za tretirano in kontrolno skupino krav.
Figure 9: Display of the concentration of Se in blood plasma as a function of time before and after parturition for the treated and control group of cows.



Slika 10: Prikaz vrednosti TAS v krvni plazmi v odvisnosti od časa pred oz. po porodu za tretirano in kontrolno skupino krav.
Figure 10: Display of the TAS value in blood plasma depending on the time before and after parturition for the treated and control group of cows.

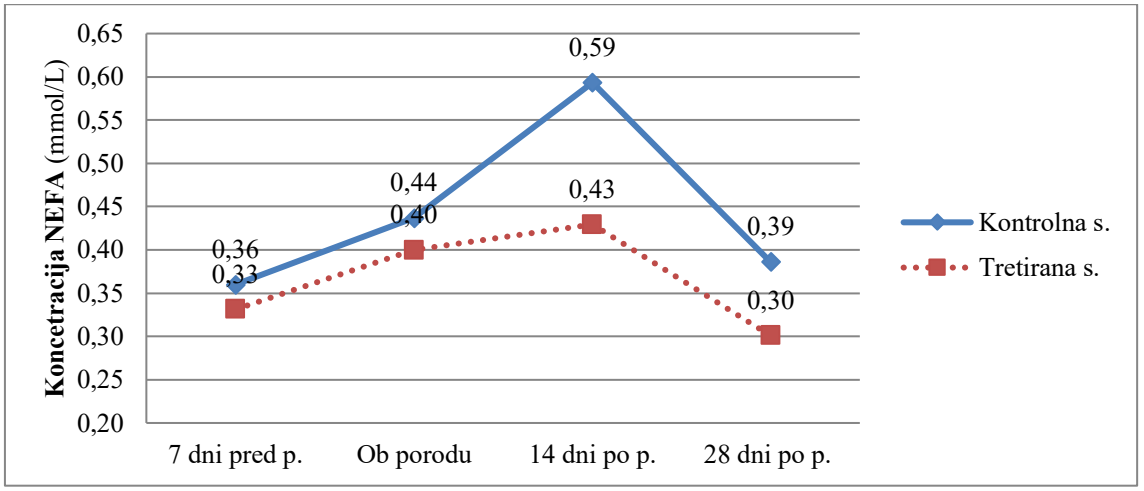


Slika 11: Prikaz vrednosti SOD v krvni plazmi v odvisnosti od časa pred oz. po porodu za tretirano in kontrolno skupino krav.
Figure 11: Display of SOD value in blood plasma depending on the time before and after parturition for the treated and control group of cows.



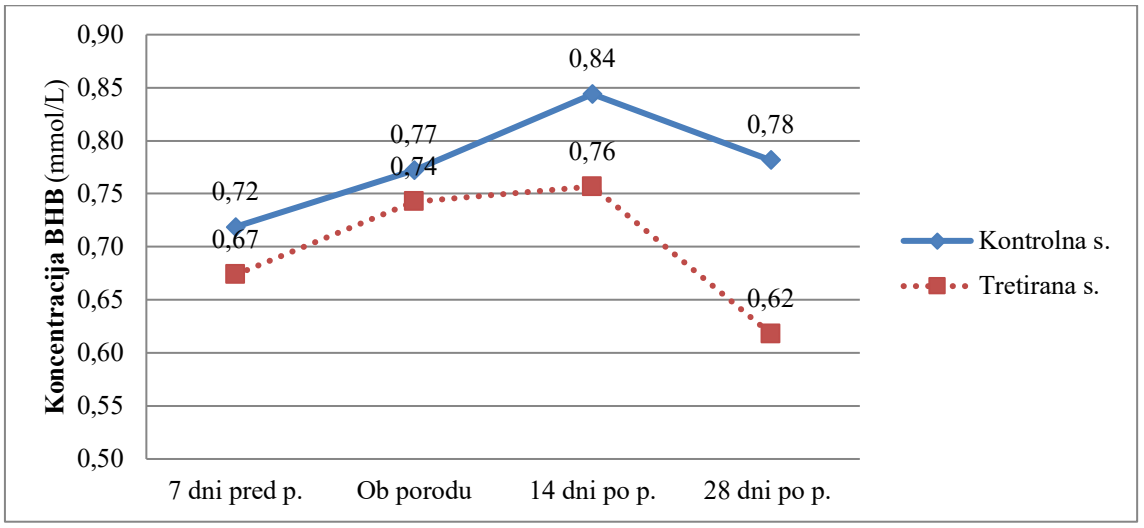
Slika 12: Prikaz vrednosti GPX v krvni plazmi v odvisnosti od časa pred oz. po porodu za tretirano in kontrolno skupino krav.

Figure 12: Display of GPX value in blood plasma depending on the time before and after parturition for the treated and control group of cows.



Slika 13: Prikaz koncentracije NEFA v krvni plazmi v odvisnosti od časa pred oz. po porodu za tretirano in kontrolno skupino krav.

Figure 13: Display of NEFA concentration in blood plasma depending on the time before and after parturition for the treated and control group of cows.



Slika 14: Prikaz koncentracije BHB v krvni plazmi v odvisnosti od časa pred oz. po porodu za tretirano in kontrolno skupino krav.
Figure 14: Display of BHB concentration in blood plasma depending on the time before and after parturition for the treated and control group of cows.

4.2 ANALIZA PLODNOSTI

Tabela 5 prikazuje primerjavo zaporedne uspešne osemenitve med kontrolno in tretirano skupino ter vrednosti plodnostnih parametrov za obe skupini. Rezultati kažejo statistično značilne razlike v uspešnosti prve osemenitve ($p=0,049$), indeksu uspešnosti osemenitve ($p=0,046$) ter v dolžini servisnega intervala ($p=0,035$), poporodnega premora ($p=0,044$) in dobi med telitvama ($p=0,039$) v prid tretirane skupine.

Tabela 5: Primerjava vrednosti plodnostnih parametrov med kontrolno in tretirano skupino.
Table 5: Comparison of values of fertility parameters between control and treated group.

		Kontrolna skupina (N=18)		Tretirana skupina (N=16)		
		Število	Delež	Število	Delež	*p*
Uspešna osemenitev	PRVA uspešna	8	0,44	9	0,56	***p=0,049***
	DRUGA uspešna	4	0,22	3	0,19	*p=0,512*
	TRETJA uspešna	3	0,17	2	0,13	*p=0,054*
	ČETRTA uspešna	3	0,17	2	0,13	*p=0,084*
	Indeks uspešnosti osemenitve	2,06		1,81		***p=0,046***
		Srednja vrednost	SD	Srednja vrednost	SD	
Parametri plodnosti	Servisni interval (št. dni)	49,67	6,58	43,81	4,18	***p=0,035***
	Servisna perioda (št. dni)	39,90	24,98	39,00	24,51	*p=0,463*
	Poporodni premor (št. dni)	71,83	30,86	60,88	26,74	***p=0,044***
	Doba med telitvama (št. dni)	356,83	30,86	345,88	26,74	***p=0,039***

Opombe: usp. – uspešna; SD - standardni odklon; p≤0,05 – razlika med kontrolno in tretirano skupino je statistično pomembna

4.3 SPREMLJANJE PATOLOŠKIH DOGAJANJ NA RODILIH IN JAJČNIKIH

V tabeli 6 so prikazani število in delež diagnosticiranih reprodukcijskih motenj (RM) za kontrolno in tretirano skupino ter statistična pomembnost razlike v pojavu med skupinama. Ker smo pri nekaterih kravah v eni in drugi skupini zabeležili več RM pri isti kravi, je v zadnjem stolpcu tabele 6 prikazano skupno število krav z eno ali več RM v kontrolni in tretirani skupini. V kontrolni skupini smo odkrili eno ali več RM pri sedmih kravah, v tretirani pa pri štirih; razlika je bila statistično pomembna ($p \leq 0,05$).

Endometritis smo odkrili pri petih kravah, od tega so bile štiri iz kontrolne skupine in ena iz tretirane. Pri treh kravah iz kontrolne skupine smo zabeležili pojav zaostale posteljice, ki se ni izločila v 24 ali več urah po porodu; v tretirani skupini ni bilo nobenega primera. Razlika je bila visoko statistično pomembna ($p \leq 0,01$). V kontrolni skupini so bile štiri tihe pojatve, v tretirani pa tri. Ovarialne ciste so se pojavile pri petih kravah iz kontrolne skupine in pri dveh iz tretirane. Pri tretirani skupini krav molznic smo tako od 14. dne po porodu diagnosticirali statistično pomembno manjše število pojavov endometritisa ($p \leq 0,05$) ter ovarialnih cist ($p \leq 0,05$) v primerjavi s kontrolno skupino. Pri pojavu tihe pojatve nismo dokazali razlike med skupinama glede na tretiranje s kombinacijo vit. AD_3E in Se.

Tabela 6: Primerjava incidence reprodukcijskih motenj (RM) v tretirani in kontrolni skupini molznic po porodu.
Table 6: Comparison of the incidence of reproductive disorders (RM) in treated and control group of dairy cows after parturition.

	Patološko dogajanje									
Skupina	Endometritis		Zaostala posteljica (24 h po porodu)		Tiha pojatev		Ovarialne ciste		Število krav z eno ali več RM	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Kontrolna skupina (N=18)	4	22*	3	17**	4	22	5	28*	7	39*
Tretirana skupina (N=16)	1	6*	0	0**	3	19	2	13*	4	25*

Opombe: *razlika med skupina je statistično pomembna ($p \leq 0,05$), ** razlika med skupina je statistično pomembna ($p \leq 0,01$).

V tabeli 7 je prikazano število in vrsta RM pri posamezni kravi iz kontrolne in tretirane skupine. V kontrolni skupini smo zabeležili RM pri sedmih kravah, v tretirani skupini pa pri štirih kravah. Iz tabele 7 je razvidno, da so bile v kontrolni skupini tri krave, pri katerih smo v poporodnem obdobju zabeležili tri RM, tri, pri katerih smo zabeležili dve RM, ter ena z eno RM. V tretirani skupini smo pri eni kravi diagnosticirali tri RM, pri ostalih treh kravah pa po eno RM.

Tabela 7: Prikaz števila RM pri posamezni kravi iz kontrolne in tretirane skupine.
Table 7: Display of the number of RM in each cow from the control and treated group.

	Posamezna krava	Endometritis	Zaostala posteljica	Tiha pojatev	Ovarialne ciste	Število RM pri posamezni kravi skupaj
Krave z RM iz kontrolne skupine	a	1	0	1	0	2
	b	1	1	1	0	3
	c	0	1	0	1	2
	d	0	1	0	1	2
	e	1	0	1	1	3
	f	1	0	1	1	3
	g	0	0	0	1	1
Krave z RM iz tretirane skupine	h	0	0	1	0	1
	i	0	0	1	0	1
	j	1	0	1	1	3
	k	0	0	0	1	1

Glede na to, ali smo pri posamezni kravi postavili diagnozo ene ali več RM, smo jih za namen statistične primerjave spremljanih vrednosti razvrstili v dve skupini (ne glede na to, ali je bila v

osnovi vključena v kontrolno oz. tretirano skupino), in sicer v skupino krav z eno ali več RM in skupino zdravih krav oz. krav brez RM.

V tabeli 8 je zato predstavljena primerjava koncentracije vit. E in Se ter vrednosti parametrov oksidativnega in metabolnega stresa med skupino molznic z eno ali več RM in skupino molznic brez motenj 14 in 28 dni po porodu. 14 dni po porodu je bila pri kravah z RM statistično pomembno nižja vrednost TAS (*p = 0,042)*, koncentracija vit. E (*p = 0,031*) in Se (*p = 0,017*) ter statistično pomembno višja vrednost NEFA (*p = 0,001*) in BHB (*p = 0,043*). V aktivnosti GPX (*p = 0,051*) in SOD (*p = 0,053*) ni bilo statistično pomembnih razlik med zdravimi in kravami z RM. 28 dni po porodu je bila pri kravah z RM še vedno statistično pomembno nižja vrednost TAS (*p = 0,036*), koncentracija vit. E (*p = 0,042*) in Se (*p = 0,014*) ter statistično pomembno višja vrednost NEFA (*p = 0,003*). V aktivnosti GPX *(p = 0,057*) in SOD (*p = 0,061*) ter vrednosti BHB (*p = 0,052*) ni bilo statistično pomembnih razlik med zdravimi in kravami z RM.

Tabela 8: Primerjava koncentracije vit. E in Se ter vrednosti parametrov oksidativnega in metabolnega stresa med skupino molznic z eno ali več RM in skupino molznic brez motenj 14 in 28 dni po porodu.
Table 8: Comparison of the concentration of vit. E and Se and values of oxidative and metabolic stress parameters between a group of dairy cows with one or more RM and a group of dairy cows without disorders 14 and 28 days after parturition.

		Krave z različnimi RM (N=11)		Zdrave krave (N=23)		
		Srednja vrednost	SD	Srednja vrednost	SD	*p*
3. VZOREC – 14 dni po porodu	TAS (mmol/L)	1,22	0,13	1,55	0,31	***0,042***
	Vit. E (µg/mL)	1,92	0,21	2,91	0,61	***0,031***
	Selen (µg/L)	95,00	8,44	110,08	17,06	***0,017***
	NEFA (mmol/L)	0,91	0,30	0,41	0,27	***0,001***
	BHB (mmol/L)	1,13	0,44	0,69	0,22	***0,043***
	SOD (U/g Hgb)	2664,33	381,79	3402,92	353,52	*0,051*
	GPX (U/g Hgb)	443,11	76,38	565,76	47,64	*0,053*
4. VZOREC – 28 dni po porodu	TAS (mmol/L)	1,24	0,25	1,44	0,17	***0,036***
	Vit. E (µg/mL)	3,14	0,44	4,16	1,02	***0,042***
	Selen (µg/L)	107,78	13,72	124,04	16,79	***0,014***
	NEFA (mmol/L)	0,77	0,14	0,34	0,20	***0,003***
	BHB (mmol/L)	0,94	0,33	0,62	0,18	*0,052*
	SOD (U/g Hgb)	2853,22	477,70	3590,24	277,64	*0,061*
	GPX (U/g Hgb)	469,11	67,43	579,68	71,10	*0,057*

Tabela 9 prikazuje podatke o številu dni, potrebnih za zaključek involucije maternice pri molznicah v posamezni skupini. Predstavljena obdobja smo razdelili v sedemdnevne intervale od sedmega dne po porodu naprej, ker smo tako opravljali ultrazvočne preglede. Razlika med skupinami glede na čas, potreben za zaključek involucije maternice, je statistično pomembna ($p \leq 0,05$) v prvem intervalu v prid tretirane skupine.

Tabela 9: Primerjava časa, potrebnega za involucijo maternice.
Table 9: Comparison of time required for uterine involution.

Št. dni po porodu	Kontrolna skupina (N=18)		Tretirana skupina (N=16)			Skupaj vse krave	
	N	%	N	%	*p*	N	%
14 – 21 dni	7	38,9	10	62,5	***0,041***	17	50
22 – 28 dni	9	50,0	6	37,5	*0,061*	15	44
29 – 35 dni	2	11,1	0	0	*0,671*	2	6
	18	100	16	100		34	100

Opomba: N – število krav pri katerih je involucija maternice zaključena

V tabeli 10 so predstavljeni korelacijski koeficienti (r) statistične povezanosti med vrednostmi TAS, vit. E., Se, NEFA, BHB, SOD in GPX ob tretjem in četrtem vzorčenju ter incidenca posamezne reprodukcijske motnje in parametri plodnosti.

Tabela 10: Korelacijski koeficienti (r) statistične povezanosti med vrednostmi TAS, vit. E., Se, NEFA, BHB, SOD in GPX ob tretjem in četrtem vzorčenju ter incidenco posamezne reprodukcijske motnje in parametri plodnosti (N=34).
Table 10: Correlation coefficients (r) of statistical association between TAS values, vit. E., Se, NEFA, BHB, SOD and GPX at the third and fourth sampling and the incidence of individual reproductive disorders and fertility parameters (N=34).

	3. VZOREC - 14 dni po porodu in pred tretjim tretiranjem							4. VZOREC – 28 dni po porodu						
	TAS	Vit. E	Se	NEFA	BHB	SOD	GPX	TAS	Vit. E	Se	NEFA	BHB	SOD	GPX
Endometritis	-0,489*	-0,457**	-0,347*	0,549**	0,462*	-0,419*	-0,474*	-0,159	-0,492**	-0,490*	0,366*	0,262	-0,519**	-0,468**
Zaostala posteljica	-0,518*	-0,390**	-0,455*	0,381**	0,367*	-0,372*	-0,433*	-0,084	-0,525**	-0,389*	0,417*	0,367*	-0,572*	-0,486*
Tiha pojatev	-0,365	-0,284	-0,155	0,573*	-0,117	-0,592	-0,485*	-0,302	-0,398	-0,339	0,437*	0,329	-0,392	-0,492
Ovarialne ciste	-0,405*	-0,390*	-0,293	0,350*	0,462*	-0,545	-0,520	-0,019	-0,565*	-0,278	0,632*	0,0475*	-0,545	-0,531
Dolžina SI	-0,545**	-0,563**	-0,300*	0,357*	-0,146	-0,721**	-0,617**	-0,023	-0,362	-0,456*	0,398*	0,274	-0,411*	-0,447*
Dolžina SP	-0,345	-0,674	-0,463	0,488*	0,568	-0,477	-0,325	-0,352	-0,559	-0,465	0,560*	0,567	-0,432*	-0,473*
Dolžina PP	-0,432	-0,496	-0,580*	0,407*	0,094	-0,849*	-0,772*	-0,288	-0,778*	-0,392	0,588*	0,479*	-0,449*	-0,391*
Dolžina DMT	-0,532*	-0,421*	-0,391*	0,617**	-0,792*	-0,449*	-0,612*	-0,388	-0,521**	-0,587*	0,578**	0,544*	-0,449*	-0,491*

Opomba: * p-vrednost (statistična značilnost) je manjša ali enaka 0,05 ($p \leq 0,05$), ** p-vrednost (statistična značilnost) je manjša ali enaka 0,01 ($p \leq 0,01$).

Ob pregledu vrednosti korelacijskih koeficientov v tabeli 10 lahko opazimo statistično pomembne povezanosti nekaterih spremljanih RM (endometritis, zaostala posteljica in ovarialne ciste) z vrednostmi TAS, koncentracijo Vit. E, Se, NEFA, BHB, SOD in GPX; tako 14 dni kot 28 dni po porodu. Pojav tihe pojatve se je izkazal kot manj statistično povezan s prej naštetimi merjenimi parametri (pomembna povezanost zgolj z NEFA in GPX). Koeficienti korelacije med pojavom endometritisa in merjenimi parametri antioksidativne zaščite, metabolnega in oksidativnega stresa (tabela 10) pri tretjem (14 dni po porodu) in četrtem (28 dni po porodu) vzorčenju kažejo visoke statistično pomembne povezanosti z nekaterimi merjenimi parametri. 14 dni po porodu se je pojav endometritisa visoko negativno povezoval z nižjimi vrednostmi TAS (r = -0,489*, $p \leq 0,01$*), nižjo plazemsko koncentracijo vit. E (r = -0,457*, $p \leq 0,01$*) in Se (r = -0,347*, $p \leq 0,05$*) ter zmanjšano aktivnostjo SOD (r = -0,512*, $p \leq 0,01$*) in GPX (r = -0,474*, $p \leq 0,01$*). 28 dni po porodu so bile statistično pomembno in visoko negativne povezanosti z nižjo plazemsko koncentracijo vit. E (r = -0,492*, $p \leq 0,01$*) ter zmanjšano aktivnostjo SOD *(r = -0,519, $p \leq 0,01$*) in GPX (r = -0,468*, $p \leq 0,01$*).

Glede na podatke v tabeli 10 se prav tako zdi, da sta dolžina SI in DMT pomembno povezani s spremljanimi parametri (TAS, Vit. E, Se, NEFA, BHB, SOD in GPX), saj je analiza pokazala visoko pomembne statistične povezanost med njimi.

4.4 ODNOS MED PARAMETRI OKSIDATIVNEGA STRESA V FF IN KRVNI PLAZMI

V tabeli 11 so prikazani korelacijski koeficienti statistične povezanosti med vrednostmi TAS, vit. E, Se, NEFA, BHB, SOD in GPX v vzorcu krvne plazme, ki smo ga odvzeli 28 dni po porodu ter vrednostmi TAS, Vit. E in Se v FF, ki smo jo prav tako punktirali 28 dni po porodu. Kot je razvidno, so bile korelacije med TAS (r = 0,466, $p \leq 0,01$), Vit. E (r = 0,540, $p \leq 0,01$) in Se (r = 0,682, $p \leq 0,01$) v krvni plazmi in FF statistično pomembne in visoke. Vrednost TAS v FF se je izkazala kot statistično značilno pozitivno povezana s koncentracijo vit. E (r = 0,733, $p \leq 0,01$) in Se (r = 0,454, $p \leq 0,01$) v krvni plazmi, koncentracija vit. E v FF je bila statistično značilno pozitivno povezana z vrednostjo TAS (r = 0,593, $p \leq 0,05$) in koncentracijo Se (r = 0,578, $p \leq 0,05$) v krvni plazmi; prav tako je bila koncentracija Se v vzorcu FF statično značilno pozitivno povezana z vrednostjo TAS (r = 0,556, $p \leq 0,05$) in koncentracijo vit. E (r = 0,682, $p \leq 0,05$) v krvni plazmi.

Vrednosti TAS in koncentracija vit. E in Se v vzorcu FF so bile negativno povezane z

vrednostmi parametrov metabolnega stresa v krvni plazmi. Statistično pomembne so se izkazale korelacije med TAS v FF in BHB v krvni plazmi (r = -0,618, $p \leq 0,01$), vit. E v FF in NEFA (r = -0,729, $p \leq 0,01$) ter koncentracija Se v FF in NEFA (r = -0,559, $p \leq 0,01$). Vse korelacije med vrednostjo TAS in koncentracijo vit. E ter Se v vzorcu FF in vrednostmi parametrov oksidativnega stresa (GPX in SOD) v krvni plazmi so se izkazale kot statistično pomembne in pozitivne.

Iz zadnjega razdelka (na desni strani) tabele 11 je razvidno, da je bila vrednost TAS v FF statistično pomembno povezana s koncentracijo vit. E v FF (r = 0,703, $p \leq 0,01$) ter koncentracijo Se v FF (r = 0,527, $p \leq 0,05$).

Tabela 11: Korelacijski koeficienti statistične povezanosti (r) med vrednostmi TAS, vit. E, Se, NEFA, BHB, SOD in GPX v krvni plazmi ter vrednostmi TAS, Vit. E in Se v folikularni tekočini (N=34) 28 dni po porodu.
Table 11: Correlation coefficients of statistical association (r) between values of TAS, vit. E, Se, NEFA, BHB, SOD and GPX in blood plasma and TAS, Vit. E and Se in follicular fluid (N=34) 28 days postpartum.

	Merjeni parametri v krvni plazmi								
	TAS	Vit. E	Se	NEFA	BHB	SOD	GPX	TAS v FF	Vit. E v FF
TAS v FF	0,466**	0,733**	0,454*	-0,555	-0,618**	0,443**	0,464*		
Vit. E v FF	0,593*	0,540**	0,578*	-0,729**	-0,306	0,512*	0,523*	0,703**	
Se v FF	0,556*	0,665*	0,682**	-0,559**	-0,416	0,577*	0,633*	0,527*	0,485*

Opomba: FF- folikularna tekočina; * p-vrednost (statistična značilnost) je manjša ali enaka 0,05 ($p \leq 0,05$), ** p-vrednost (statistična značilnost) je manjša ali enaka 0,01 ($p \leq 0,01$).

4.5 PRENOS ZARODKA

V tabeli 12 so prikazane povprečne vrednosti vit. E, Se, TAS in NEFA v krvni plazmi telic, ločeno za tretirano in kontrolno skupino. Kot je razvidno iz tabele 12, smo ugotovili statistično značilne razlike med tretirano in kontrolno skupino v koncentraciji vit. E ($p = 0,001$) in Se ($p = 0,002$) v krvni plazmi. Statistično značilno višje so bile pri skupini telic, ki so prejele dva odmerka kombinacije vitaminov AD$_3$E ter Se. Prav tako so bile vrednosti NEFA v tej skupini telic pomembno nižje ($p = 0,035$). Razlika v vrednostih TAS je bila prav tako statistično pomembna ($p = 0,050$); vidimo, da so vrednosti pomembno višje pri tretirani skupini. Prenos zarodkov oz. implantacija zarodkov je bila uspešna pri 7 telicah iz kontrolne skupine (41,2 % uspešnost) ter pri 11 telicah (64,7 % uspešnost), ki so vzporedno s sinhronizacijo estrusa prejele Se in kombinacijo vitaminov AD$_3$E. Razlika med skupinama glede uspešnosti implantacije je statistično pomembna ($p = 0,049$).

Tabela 12: Primerjava vrednosti parametrov vit. E, Se, TAS in NEFA med kontrolno in tretirano skupino telic ter število uspešnih oploditev telic v posamezni skupini.
Table 12: Comparison of values of parameters vit. E, Se, TAS and NEFA between control and treated heifer groups and the number of successful insemination of heifers in each group.

Skupina	Parameter	Vit. E (µg/mL)	Se (µg/L)	TAS (mmol/L)	NEFA (mmol/L)	N brejih	% brejih
Kontrolna (N=17)	Povprečna vrednost	2,76	104,65	1,29	0,63	7	41,2
	SD	0,41	16,82	0,09	0,47		
Tretirana (N=17)	Povprečna vrednost	3,69	126,71	1,40	0,35	11	64,7
	SD	0,41	16,45	0,12	0,22		
	p	***0,001***	***0,002***	***0,050***	***0,035***	***0,049***	

Glede na to, ali je bil ET uspešen ali ne, smo telice razvrstili v dve skupini in primerjali koncentracije vit. E in Se ter vrednosti TAS in NEFA. V tabeli 13 je prikazana primerjava vrednosti parametrov vit. E, Se, TAS in NEFA med uspešno in neuspešno oplojeno skupino telic.

Kot je razvidno iz tabele 13, je statistična analiza pokazala pomembno višjo koncentracijo vit. E ($p = 0,001$) in Se ($p = 0,033$) v krvni plazmi pri skupini telic, pri kateri je bila implantacija uspešna. Razlika v vrednostih TAS in NEFA med telicami, pri katerih je bila implantacija uspešna, in med skupino, pri kateri je bila neuspešna, je bila prav tako statistično pomembna. Vrednosti TAS so pomembno višje v skupini tretiranih telic ($p = 0,044$), kar nakazuje manjši oksidativni stres te skupine. Vrednosti parametra NEFA so bile nižje pri skupini brejih telic ($p = 0,049$), kar nakazuje boljšo energijsko bilanco te skupine.

Tabela 13: Primerjava vrednosti parametrov vit. E, Se, TAS in NEFA med uspešno in neuspešno oplojeno skupino telic.
Table 13: Comparison of values of Parameters vit. E, Se, TAS and NEFA between successfully and unsuccessfully inseminated heifers.

Skupina	Parameter	Vit. E (µg/mL)	Se (µg/L)	TAS (mmol/L)	NEFA (mmol/L)
Neuspešna implantacija (N=16)	Srednja vrednost	2,89	108,53	1,32	0,61
	SD	0,55	19,94	0,11	0,48
Uspešna implantacija - breje telice (N=18)	Srednja vrednost	3.55	122,82	1,53	0,37
	SD	0,50	17,49	0,13	0,23
	p	***0,001***	***0,033***	***0,044***	***0,049***

V tabeli 14 so prikazani korelacijski koeficienti statistične povezanosti med vrednostmi vit. E, Se, TAS in NEFA v krvni plazmi vseh telic, vključenih v raziskavo. Korelacijski koeficienti linearne povezanosti med vrednostmi parametrov, ki smo jih izmerili v vzorcu krvne plazme, kažejo visoko pozitivno povezanost med vrednostmi vit. E in Se (r = 0,671, $p \leq 0,01$). Visoko pozitivna je tudi povezanost med vrednostmi teh dveh parametrov in uspešnostjo implantacije zarodka (vit. E in uspešnost, r = 0,524, $p \leq 0,01$; Se in uspešnost, r = 0,374, $p \leq 0,05$).

Vrednosti TAS so visoko pozitivno povezane z vrednostmi vit. E (r = 0,421, $p \leq 0,05$) in Se (r = 0,392, $p \leq 0,05$) ter visoko pozitivno z uspešnim transferom (r = 0,483, $p \leq 0,05$). Vrednosti parametra NEFA so pomembno visoko negativno povezane z vrednostjo Se (r = -0,354, $p \leq 0,05$) in vit. E (r = -0,601, $p \leq 0,01$); prav tako se je izkazalo, da so bile vrednosti NEFA statistično pomembno nižje pri tistih telicah, pri katerih je bila implantacija uspešna (r = -0,323, $p \leq 0,05$).

Tabela 14: Korelacijski koeficienti statistične povezanosti (r) med vrednostmi vit. E, Se, TAS in NEFA v krvni plazmi elic (N=34).
Table 14: Correlation coefficients of statistical association (r) between the values of vit. E, Se, TAS and NEFA in blood plasma of heifers (N=34).

	TAS	Vit. E	Se	NEFA
Vit. E	0,421*			
Se	0,392*	0,671**		
NEFA	-0,241	-0,601**	-0,353*	
Uspešna implantacija	0,483*	0,542**	0,374*	-0,323*

Opomba: * *p*-vrednost (statistična značilnost) je manjša ali enaka 0,05 ($p \leq 0,05$), ** *p*-vrednost (statistična značilnost) je manjša ali enaka 0,01 ($p \leq 0,01$).

5 RAZPRAVA

Tudi v govedoreji se ne moremo izogniti negativnim učinkom podnebnih sprememb in segrevanju ozračja, zato je iskanje preventivnih metod in tehnik nujno za izboljšanje dobrobiti živali ter zmanjšanje ekonomskih izgub. Pogoji so vse bolj zahtevni in ker so krave molznice med bolj občutljivimi na vplive pregrevanja in vročinskega stresa, je raziskovanje, iskanje in uvajanje preventivnih ukrepov toliko bolj smiselno in ekonomsko upravičeno. Poleg tega vedno večje proizvodne zahteve, spremembe v genetiki živali ter dvig cen zdravljenja narekujejo iskanje novih preventivnih ukrepov. Obporodno oz. prehodno obdobje je pri molznicah še posebej pomembno predvsem z vidika fizioloških sprememb, ki se dogajajo in ki povzročijo merljive spremembe v diagnostičnih parametrih krvi in FF. Visoke presnovne zahteve po porodu in v zgodnji laktaciji vključujoč presnovne spremembe lipidov in beljakovin vplivajo na oksidativni status krav molznic, na spremenjene potrebe po hrani in povečano potrebo po energiji. Oksidativni in metabolni stres, ki sta posledica vseh obremenjujočih dogajanj v organizmu, imata ključno vlogo pri nastanku oz. napredovanju številnih bolezni. Če obporodno obdobje pri molznici nastopi v vročih poletnih mesecih, ima vročinski stres še dodaten negativen vpliv na oksidativni in metabolni status molznic ter posledično na reprodukcijske parametre in na splošno zdravje goveda. Poznavanje vplivov oksidativnega, vročinskega in metabolnega stresa na procese v telesu prav v obdobju pred in po telitvi je pomembno tako za zagotavljanje zdravja živali kot tudi z gospodarskega vidika, saj so od teh vplivov v veliki meri odvisni tudi reprodukcijski parametri (Badinga in sod., 1993, Ratiznojnik 2012; De Rensis in Scaramuzzi, 2003; Bernabucci in sod., 2005; Castillo in sod., 2005; Sordillo in Aitken, 2009).

Preventivno dodajanje Se in vit. E se je že izkazalo za uspešno pri zmanjševanju različnih zdravstvenih težav goveda in zmanjševanju pojava reprodukcijski motenj v čredi, predvsem v poletnih mesecih, ko vročinski stres še dodatno oslabi delovanje imunskega sistema goveda (Brzezinska-Slebodzinska in sod., 1994; Allison in Laven, 2000; Smith in sod., 1984; Weiss in sod., 1997). V naši raziskavi smo želeli preveriti, ali bo imelo tretiranje živali s kombinacijo vit. AD$_3$E in Se pozitivne učinke na zmanjševanje oksidativnega, metabolnega in vročinskega stresa ter njegovih posledic na zdravje in reprodukcijske parametre. V ta namen smo določili koncentracijo vit. E in Se, aktivnosti SOD in GPX ter vrednosti TAS, NEFA in BHB v krvni plazmi pri tretirani skupini molznic in kontrolni skupini v štirih zaporednih merjenjih v razponu enega tedna pred porodom in štirih tednov po porodu.

5.1 STATUS VITAMINA E IN SELENA

5.1.1 Vitamin E

Količina vnosa v maščobi topnega vit. E je eden izmed bolj pomembnih dejavnikov za zdravje molznic; pomanjkanje negativno vpliva na njihovo produktivno in reprodukcijsko zmogljivost (Jain in sod., 1988; Passi in sod., 1991; Kökçam in Naziroğlu, 1999; Briganti in Picardo, 2003). Govedo teh vitaminov ne more samo proizvesti, zato je za izpolnjevanje fizioloških potreb in ohranjanje visoke proizvodne zmogljivosti potrebna redna oskrba. Molznice v poporodnem obdobju doživijo intenzivne spremembe v mlečni žlezi zaradi priprave na proizvodnjo kolostruma in mleka. Ker je koncentracija vit. E v kolostrumu zelo visoka, se koncentracija tega vitamina v krvnem obtoku med telitvijo zmanjša (Goff in Stabel, 1990), kar povzroča številne zdravstvene težave in s tem zmanjša ješčnost v poporodnem obdobju. Zmanjšanje koncentracije vit. E je posledica različnih dejavnikov, kot so rast mlečne žleze oz. vimena, prenos vitaminov v kolostrum in mleko, sprememba vnosa vitaminov, hormonske spremembe (Weiss, 1998; Goff in Stabel, 1990).

V tabeli 4 so prikazane povprečne vrednosti vit. E v vzorcih krvne plazme, ki smo jih odvzeli sedem dni pred predvidenim porodom, na dan poroda, ter 14. in 28. dan po porodu. Vrednosti smo primerjali in ugotavljali ali obstajajo razlike med tretirano in kontrolno skupino krav. Sedem dni pred porodom oz. pred prvim tretiranjem je bila razlika med skupinama minimalna (2,74 µg/mL v kontrolni in 2,78 µg/mL v tretirani skupini). Če upoštevamo navedbe Kumagai in Chaipan (2004), da koncentracija vit. E v krvni plazmi začne upadati 15 dni pred telitvijo, so bile koncentracije pred prehodnim obdobjem verjetno višje od 3 µg/mL in po navedbah Wolfa in sod. (1998) zadostne. Ob porodu, 14 in 28 dni po porodu pa je razlika v koncentraciji vit. E že statistično pomembno višja v tretirani skupini krav. Najnižje vrednosti v eni in drugi skupini smo zabeležili 14 dni po porodu (2,40 µg/mL v kontrolni oz. 2,94 µg/mL v tretirani skupini), kar je podobno izsledkom raziskave Konvične in sod. (2015), kjer so izmerili povprečno vrednost vit. E sedem dni po porodu, in sicer 2,45 µg/mL. V isti raziskavi so bile vrednosti ob tej meritvi (sedem dni po porodu) statistično pomembno nižje kot vrednosti šestih oz. devetih tednov po porodu, s čimer so podobni tudi naši rezultati. Toda naši rezultati se razlikujejo od navedb Oldhama in sod. (1991), kjer ugotavljajo, da začnejo vrednosti vit. E v krvi padati že 15 dni pred telitvijo in dosežejo najnižjo vrednost v času telitve. Znano je, da se tik pred telitvijo koncentracija nekaterih antioksidantov, med katerimi je vit. E, zmanjša na raven, ki bi jo sicer

enačili s kroničnim pomanjkanjem, vendar je pomembno, da začnejo nato vrednosti naraščati 14. do 21. dan po porodu (Goff in Stabel, 1990).

Kot je prikazano na sliki 8 (koncentracija vit. E v krvni plazmi v odvisnosti od časa pred oz. po porodu za kontrolno in tretirano skupino krav), je dobro razvidno, da je obporodno in poporodno dogajanje vplivalo na znižanje koncentracijo vit. E ob porodu in 14 dni po porodu pri kontrolni skupini. Za razliko od tega, je razvidno, da se je vrednost pri tretirani skupini rahlo povečala v obdobju sedem dni pred porodom in do poroda; med porodom in 14 dni po porodu je ostala na podobnem nivoju oz. se celo nekoliko zvišala. Slednje lahko verjetno pripišemo vplivu tretiranja. Plazemska koncentracija 14 dni po porodu do 28 dni po porodu se je nato povečevala v obeh skupinah in bila 28 dni po porodu že zadostna v tretirani skupini (Wolf in sod., 1998). Profil gibanja vit. E je podoben kot v raziskavi Weissa in sod. (1997) s to razliko, da so pri njih ugotovili, da se vrednosti vit. E začnejo vzpenjati šele štiri tedne po porodu in so na zadostni ravni šele deveti teden po porodu. V naši raziskavi so vrednosti začele naraščati prej in dosegle zadostno raven v tretirani skupini že štiri tedne po porodu (4,50 µg/mL). V kontrolni skupini so bile v istem obdobju glede na navedbe različnih avtorjev (Wolf in sod., 1998: Weiss in sod., 1997) o optimalni ravni koncentracije vit. E že blizu zadostne ravni (3,25 µg/mL).

Naši rezultati so skladni z izsledki Panda in Kaur (2005) in Pinottija in sod. (2020), ki navajajo, da lahko strm padec koncentracije vit. E ob oz. po porodu zmanjšamo z dodajanjem prehranskega dodatka z vit. E. Nadalje ima to pozitiven učinek na antioksidativni status, imunsko odpornost goveda, na splošno peripartalno reprodukcijsko učinkovitost in energijski status krav molznic po porodu (Bouwstra in sod., 2010).

5.1.2 Selen

Tudi Se je pomemben pri antioksidativni obrambi, saj se kot lovilec ROS vključuje v obrambo pred oksidativnim stresom. Kot naraven antioksidant vpliva na reprodukcijo in rast, ščiti tkiva in je ključnega pomena pri odzivu imunskega sistema (Suttle, 2010); dokazan je njegov pomemben pozitiven vpliv na zdravje in reprodukcijo goveda (Sordillo in Aitken, 2009; Babnik, 2013; Ewing in Charlton, 2007; Foltys in sod., 2001; MacPherson in sod., 1984; Underwood in Suttle, 1997; Harrison in Conrad, 1984). Iz tabele 2 in 3 je razvidno, da so imele vse živali, vključene v raziskavo, pokrite dnevne prehranske potrebe po Se (za krave molznice okvirno 0,300 mg/kg suhe snovi (Longnecker in sod., 1996; Ellis in sod., 1997), saj je bila vsebnost Se v osnovnem obroku (0,235 mg/kg SS) in v močnih krmilih (0,355 mg/kg).

V tabeli 4 so prikazane povprečne koncentracije Se v vzorcih krvne plazme, ki smo jih odvzeli sedem dni pred predvidenim porodom, na dan poroda ter 14 dni in 28 dni po porodu. Kot je razvidno iz rezultatov, pred prvim tretiranjem ni bilo statistično značilne razlike med skupinama. Kot že omenjeno v uvodu so bile ne glede na različne navedbe avtorjev (Juniper in sod., 2006, Dargatz in Ross, 1996; Villard in sod., 2002; Harrison in sod.; 1984) glede spodnje in zgornje meje zadostne koncentracije Se v krvni plazmi povprečne vrednosti v obeh skupinah znotraj meja zadostnih vrednosti prej omenjenih avtorjev. V preostalih vzorčenjih (ob porodu, 14 dni po porodu in 28 dni po porodu) je bila razlika v koncentraciji Se statistično značilno višja pri tretirani skupini, kar pripisujemo učinku tretiranja.

Slika 9 prikazuje gibanje koncentracij Se v krvni plazmi med raziskavo pri tretirani in kontrolni skupini. Pri kontrolni skupini smo najnižjo koncentracijo zabeležili 14 dni po porodu (95,94 µg/L), najvišjo pa že 28 dni po porodu (106,72 µg/L). Pri tretirani skupini je trend gibanja koncentracije Se nekoliko drugačen. Kot je razvidno iz slike 9, je bila najnižja koncentracija sedem dni pred predvidenim porodom (98,50 µg/L); nato sledi naraščanje do poroda (118, 81 µg/L), rahel, komaj opazen padec 14 dni po porodu (117,50 µg/L) ter skokovit porast do 28. dne po porodu. Tudi Konvična in sod., (2015) ugotavljajo, da so koncentracije Se najnižje v prehodnem obdobju; v primerjavi z vit. E začnejo prej upadati, vendar po koncu prehodnega obdobja hitreje narastejo ter so štiri do šest tednov po porodu že na optimalni ravni. Vse to seveda ob primerni prehrani, ki zadovoljuje zgoraj omenjene prehranske potrebe po Se.

Vit. E in Se sta prehranska antioksidanta; v kombinaciji sta t. i. celularna antioksidanta z medsebojno soodvisno antioksidativno funkcijo (Chauhan in sod; 2014). Pomembna sta zaradi njunega prispevka k nevtralizaciji ROS. Vit. E nevtralizira ROS s tvorbo prooksidantnega radikala vit. E, medtem ko se Se porablja oz. aktivira pri tvorbi zaščitnega sistema antioksidanta GPX. V prehodnem obdobju je koncentracija ROS pri kravah najvišja. V tem obdobju je antioksidativni obrambni sistem visoko obremenjen zaradi oksidativnega stresa in presnovnih obremenitev, zato se plazemske zaloge vit. E in Se zmanjšujejo, ker se oba izčrpavata za obrambo pred ROS. Zmanjševanje koncentracij je lahko nadalje povezano z nizkim antioksidativnim statusom, reprodukcijskimi motnjami in boleznimi (LeBlanc in sod., 2004). Rezultati pri tretirani skupini krav pa govorijo v prid temu, da smo s preventivnim dodajanjem kombinacije vit. AD$_3$E in Se uspeli ublažiti porabo in preprečiti padec plazemske koncentracije tako vit. E kot Se.

5.2 ANTIOKSIDANTNI STATUS

Pri kravah v obporodnem obdobju tkiva porabijo več kisika; povečana je presnova, da zagotovijo energijo potrebno za začetek laktacije. To povečanje presnovne aktivnosti povzroči povečano kopičenje ROS in izčrpavanje pomembne antioksidativne obrambe v času telitve (Sordillo, 2005). Prekomerna proizvodnja ROS skupaj s poškodbami na celični ravni oslabi celične antioksidantne obrambne sisteme, vključujoč antioksidativne encimske sisteme (SOD in GPX) ter neencimske sisteme (vit. E in Se). Oksidativni stres je mogoče spremljati z več biomarkerji (SOD, GPX, vit. E, Se, TAS), katerih spremembe vrednosti potrjujejo, da se v pozni brejosti, med telitvijo in začetkom laktacije pri kravah molznicah pojavi oksidativni stres.

5.2.1 TAS

Vrednost parametra TAS izraža sposobnost organizma za odstranjevanja ROS oz. antioksidativno sposobnost po nevtralizaciji ROS (Ghiselli in sod., 2000). Iz tabele 4 je razvidno, da se vrednosti TAS sedem dni pred predvidenim porodom in ob porodu niso statistično pomembno razlikovale med tretirano in kontrolno skupino, vendar so razlike med skupinama statistično pomembne 14 dni in 28 dni po porodu, in sicer je TAS višji pri skupini krav, ki je prejela kombinacijo vit. AD$_3$E in Se. Na podlagi slike 10, ki prikazuje gibanje vrednosti TAS med raziskavo pri kontrolni in tretirani skupini krav, se vidi, da so bile vrednosti najprej zelo podobne; učinek tretiranja se je pokazal šele 14 dni po porodu. 14 dni po porodu so bile vrednosti TAS v obeh skupinah najvišje glede na vrednosti v času celotne raziskave; 28 dni po porodu so že začele upadati. Pri tretirani skupini so bile vrednosti TAS še vseeno višje kot sedem dni pred porodom in ob porodu. V kontrolni skupini opažamo drugačen trend gibanja, in sicer je 28 dni po porodu vrednost TAS padla oz. je bila najnižja v primerjavi z ostalimi tremi vrednostmi (sedem dni pred porodom in ob porodu), kar je verjetno posledica izčrpavanja zalog mineralov in vitaminov zaradi intenzivne laktacije. Z napredovanjem laktacije je postopno upadanje antioksidativne aktivnosti posledica izčrpavanja v maščobi topnih antioksidantov z mlekom (Castillo in sod. 2005).

Višje vrednosti TAS v tretirani skupini 14 dni po porodu ter manjši upad 28 dni po porodu nakazujejo, da se lahko antioksidativni sistem, ki mu pomagamo z dodajanjem mineralov in vitaminov, začne takoj po telitvi učinkovito spopadati s proizvodnjo lipoperoksida v tem kritičnem obdobju in tako ščiti pred oksidativnim stresom (Brzezinska-Slebodzinska in sod., 1994; Campbell in Miller, 1998; Miller in sod., 1993; Castillo in sod., 2005). Dodajanje

antioksidantov je očitno povečalo učinkovitost odziva na poporodno dogajanje.

Povišanje ravni TAS v drugem tednu po porodu in še vedno relativno visoke vrednosti ob zadnjem merjenju, štiri tedne po porodu, nakazujejo, da presnova krav proizvaja perokside hitreje, kot se lahko z njimi spopade njihov antioksidativni sistem. Stanje oksidativnega stresa je lahko posledica povečane izpostavljenosti oksidantom ali zmanjšane zaščite pred oksidanti ali celo obeh težav, ki se pojavljata hkrati (Davies in sod, 2004). Interpretacija sprememb serumskega antioksidantnega statusa je odvisna od pogojev, pod katerimi se določa serumski antioksidativni status. Povečana vrednost TAS v serumu ni nujno zaželeno stanje, če je posledica adaptivnega odziva na povečan oksidativni stres. Podobno znižanje serumskega TAS ni nujno nezaželeno stanje, ko se proizvodnja reaktivnih vrst zmanjša. Davies in sod. (2004) opozarjajo, da vrednost parametra TAS sama po sebi bolj malo pove o stanju oksidativnega stresa, saj je lahko npr. nizka vrednost TAS posledica majhnih vrednosti ROS oz. nizke izpostavljenosti in aktivacije antioksidativnega sistema ali pa povečane izpostavljenosti ROS in prekomernega izčrpavanja antioksidantov in s tem zmanjšane zaščite pred ROS. Iz tega sledi, da je za bolj zanesljivo oceno oksidativnega statusa potrebno upoštevati več različnih parametrov (npr. GPX, SOD, stanje vit. E in Se).

V naši raziskavi opazimo tudi veliko variacijo rezultatov TAS pri vseh merjenjih, še posebej pri kontrolni skupini krav. To kaže na to, da se molznice zelo različno odzivajo in prilagajajo na presnovne zahteve, ki jih nalagajo porod, proizvodnja kolostruma in začetek laktacije. Verjetno se prilagoditve med posameznimi kravami zelo razlikujejo kot posledica individualnih razlik v zmogljivosti za regulacijo porazdelitve hranil.

5.2.2 SOD

SOD predstavlja prvo linijo obrambe pred ROS (Chapple, 1997). Pri telitvi predstavljajo encimi SOD in GPX glavne komponente antioksidativne obrambe pri zaščiti celic pred povečanim ROS. SOD katalizira dismutacijo superoksidnega radikala v vodikov peroksid, ki se dalje presnovi v vodo z encimom GPX (Bernabucci in sod., 2005).

Rezultati, ki smo jih pridobili v naši raziskavi (tabela 4, slika 11), kažejo, da se je povprečna aktivnost SOD v celotnem spremljanem času postopoma povečevala tako pri tretirani kot kontrolni skupini. Rezultati so primerljivi s študijo Konvične in sod. (2015), kjer so spremljali vrednosti SOD od treh tednov pred porodom do devetih tednov po porodu. V spremljanem intervalu so vrednosti prav tako počasi naraščale in dosegle vrh devet tednov po porodu.

Zviševanje vrednosti SOD od poroda naprej je posledica prizadevanja organizma, da se prilagodi visoki ravni proizvodnje ROS (Bernabucci in sod., 2005). Med našim poskusom so se aktivnosti SOD postopoma povečevale, kar je verjetno posledica odziva organizma na večjo tvorbo superoksida, zlasti po telitvi. Višja aktivnost SOD eritrocitov na dan poroda in v nadaljnjih 28 dneh kaže na višji oksidativni stres in nižji antioksidativni status (Bernabucci in sod., 2005).

Iz tabele 4 je razvidno, da pri prvem vzorčenju razlika v aktivnosti SOD ni bila statistično značilna med skupinama krav, vendar vseeno opazimo, da je bil SOD višji pri tretirani skupini že ob prvem vzorčenju oz. pred prvim tretiranjem. Statistično značilna razlika oz. višje vrednosti SOD pri tretirani skupini so se pokazale že po prvem tretiranju oz. ob drugem vzorčenju (ob porodu) in do konca opravljanja raziskave. Glede na višjo aktivnost SOD v tretirani skupini lahko sklepamo, da smo jo dosegli z dodajanjem Se in kombinacije vit. AD_3E. Pretekle raziskave (Stỳblo in sod. 2007; Dzobo in Naik, 2012; Jihen in sod., 2008) so navajale predvsem pozitiven učinek dodajanja Se na aktivnost SOD, medtem ko je dodajanje vit. E pokazalo učinek samo v nekaterih raziskavah (Giray in sod., 2003; Singh in sod., 2014; Ziaie in sod., 2011); v našem primeru ne moremo razločevati, kateri izmed dodanih vitaminov oz. mikroelementov je povezan z višjo aktivnostjo SOD v tretirani skupini. Glede na to, da smo pričakovali, da bomo s tretiranjem zmanjševali oksidativni stres, torej nižjo aktivnost SOD, se je izkazalo, da samo dodajanje antioksidantov ni dovolj za preprečevanje nastanka ROS v obporodnem in poporodnem obdobju. Toda dodajanje kombinacije vit. AD_3E in Se je okrepilo aktivnost SOD; s tem je bilo pri tretirani skupini krav odstranjevanje ROS hitrejše in bolj učinkovito, kar je nadalje pomenilo manj negativnih učinkov oksidativnega stresa na delovanje in zdravje krav. Aktivnost SOD se zaradi nastanka ROS po telitvi pri kravah molznicah poveča ne glede na dodajanje antioksidantov. Več študij je prav tako pokazalo, da antioksidativna zmogljivost pri kravah molznicah v obporodnem obdobju ni zadostna za preprečitev povečanja nastanka ROS (Bernabucci in sod., 2005; Castillo in sod., 2005).

5.2.3 GPX

GPX je sistem encimov, katerih glavna biološka vloga je zaščita organizma pred oksidativnimi poškodbami (Hall in sod., 2013). Odvisen je od koncentracije Se v telesu (Surai in Fisinin, 2014), zato lahko status Se ocenjujemo bodisi neposredno iz koncentracije Se ali posredno iz ocene aktivnosti GPX (Hall in sod., 2013).

Aktivnost encima GPX pri kravah, vključenih v našo raziskavo, je prikazana v tabeli v tabeli 4 in na sliki 12. Pred prvim tretiranjem oz. sedem dni pred porodom med skupinama ni bilo statistično pomembne razlike v aktivnosti GPX. Kasneje, ob porodu, 14 in 28 dni po porodu je bila razlika med skupinama statistično pomembna. Kot je razvidno iz slike 12, se krivulja gibanja aktivnosti GPX tudi nekoliko razlikuje med skupinama. Pri kontrolni skupini aktivnost GPX ob porodu v primerjavi s sedem dni pred porodom nekoliko upade; nato se začne dvigovati, tako da je 14 dni po porodu že nad vrednostmi, ki smo jih zabeležili sedem dni pred porodom. Nato se do 28. dne po porodu aktivnost GPX še nekoliko zviša. Zmanjšanje aktivnosti GPX v kontrolni skupini ob porodu lahko razlagamo kot povečanje obporodnega oksidativnega stresa. Podobne podatke so pridobili Festila in sod. (2012), ki so razlagali zmanjšanje povprečne vrednosti GPX v krvi pri kravah molznicah od poroda do sedmih dne po porodu kot izgubo homeostatskega nadzora v poporodnem obdobju. Rezultati v kontrolni skupini so skladni z izsledki Konvične in sod. (2015), ki so pri kravah ob telitvi zabeležili pomembno ($p \leq 0,05$) zmanjšanje aktivnosti GPX v primerjavi s kravami štiri tedne po telitvi.

Pri tretirani skupini krav pa se povprečne vrednosti aktivnosti GPX ob porodu v primerjavi s sedem dni pred porodom niso zmanjšale, ampak opazimo rahel dvig. Nato sledi izrazito zvišanje aktivnost od poroda do 14. dne po porodu ter nato še rahlo zvišanje aktivnosti do 28. dne po porodu pri tretirani skupini. Tako v celotnem intervalu izvajanja raziskave opažamo zvišanje aktivnosti GPX, ki ga verjetno lahko pripišemo delovanju dodatka Se in vit. AD_3E, glede na to, da so bili ostali pogoji za vse živali enaki. Ker je encim GPX odvisen od vsebnosti Se, rezultati niti ne presenečajo. Pojavi se enak dvom kot pri SOD, saj tudi tu ne moremo razločevati, ali je zvišanje aktivnosti GPX posledica dodajanja Se ali AD_3E ali kombinacije obojega.

Visoke oz. višje vrednosti GPX v obeh skupinah 14 dni oz. 28 dni po porodu lahko razlagamo kot prizadevanje organizma, da se prilagodi visoki ravni proizvodnje ROS. Rezultati nakazujejo, da se v obporodnem in poporodnem obdobju nastanku oksidativnega stresa tudi s tretiranjem z antioksidanti ne moremo izogniti. Ima pa tretiranje učinek na zvišanje aktivnosti GPX in zato je posledično odstranjevanje ROS hitrejše in bolj učinkovito. Glede na to, da je encim GPX odvisen od statusa Se (Mates in sod., 1999) so rezultati pričakovani, torej da zvišanju vrednosti Se v krvni plazmi sledi zvišanje aktivnosti GPX. To je razvidno tudi iz gibanja krivulje koncentracije Se v krvni plazmi (slika 9) in aktivnosti GPX (slika 12) pri tretirani skupini, saj sta le-ti precej podobni. Porastu koncentracije Se je očitno sledil porast aktivnost GPX. Rezultati so primerljivi z raziskavami pri miših in podganah (Stỳblo in sod.

2007; Dzobo in Naik, 2012; Jihen in sod., 2009; El-Boshy in sod., 2015), ki kažejo, da dodajanje Se povzroči povečanje aktivnosti GPX.

5.3 METABOLNI STRES

Obporodno obdobje med pozno brejostjo in začetkom laktacije zahteva tudi hitro presnovno prilagoditev molznic, rast ploda, telitev in začetek laktacije, ki povzročajo povečane energijske potrebe. Zato so krave v tem obdobju nagnjene k NEB, ko potrebe po energiji presegajo prehranski vnos. V primerih, ko potrebe po energiji niso izpolnjene s prehrano ali dodatki, molznice kot vir energije izkoriščajo lastne maščobne zaloge. Obremenjenost presnove krav smo poskušali določiti z merjenjem koncentracije BHB in NEFA v krvni plazmi, ki se sicer uporabljata za določanje presnovnega profila in spremljanje zdravstvenega, reprodukcijskega in prehranskega stanja goveda (LeBlanc, 2010b). Vrednosti BHB nad 0,80 mmol/L (Ježek in sod., 2017) in NEFA nad 0,5 mmol/L (Adewuyi in sod., 2005) po telitvi so povišane in znak blage do zmerne NEB. Ob pregledu rezultatov v tabeli 4 vidimo, da so se vrednosti BHB in NEFA tako pri tretirani kot pri kontrolni skupini krav od prvega vzorčenja, sedem dni pred in do zadnjega vzorčenja, 28 po porodu, gibale znotraj mej blage do zmerne NEB. Različni avtorji (LeBlanc, 2010b; Schillo, 1992; Vanholder in sod., 2004; Opsomer in sod., 1998; Leroy in sod. 2004) navajajo, da pride do največjih sprememb oz. najvišjih vrednosti v koncentraciji NEFA in BHB dva tedna po telitvi, ko so živali v najbolj izraziti NEB. Kot je razvidno iz tabele 4 ter slik 13 in 14, so povprečne vsebnosti NEFA in BHB v krvni plazmi nihale od konca brejosti do začetka laktacije, pri čemer je najvišja vrednost v obeh skupinah 14 dni po porodu in najnižja vrednost 28 dni po porodu, kar je skladno z ugotovitvami zgoraj omenjenih avtorjev. Opaženo zvišanje ravni NEFA v serumu po 14 dneh po porodu verjetno odraža visoko ekstrakcijo NEFA v mlečni žlezi za sintezo mlečne maščobe ter povezane endokrine spremembe, zlasti zmanjšanje ravni rastnega hormona in zvišanje ravni inzulina. Toda zvišane ravni NEFA v serumu lahko odražajo tudi učinek vsebnosti ogljikovih hidratov brez vlaknin v prehrani.

Primerjava vrednosti NEFA in BHB med kontrolno in tretirano skupino (tabela 4) kaže, da pri prvem in drugem vzorčenju (torej sedem dni pred porodom in ob porodu) ni bilo statistično pomembnih razlik med skupinama, ob tretjem in četrtem vzorčenju (14 in 28 dni po porodu) pa so vrednosti BHB in NEFA statistično pomembno višje pri skupini krav, ki niso prejemale dodatka vit. AD$_3$E in Se. Sklepamo torej, da so bile tretirane krave manj izpostavljene NEB. Na podlagi primerjave gibanja vrednosti NEFA in BHB (sliki 13 in 14) vidimo, da so vrednosti

obeh parametrov veliko bolj nihale pri kontrolni skupini, medtem ko je krivulja vrednosti BHB in NEFA veliko bolj stanovitna pri tretirani skupini. To kaže na to, da smo s preventivnim dodajanjem antioksidantov ublažili učinke metabolnega stresa. Naši rezultati se ujemajo z rezultati Vandehaar in sod. (1999), ki so že ugotovili, da hranjenje v obdobju pred porodom z obrokom visoke energijske vrednosti z dodatkom vit. E in Se vodi do zmanjšanja koncentracije NEFA in BHB v krvi. Zmanjšana lipogeneza in povečana lipoliza v adipocitih povzročita zvišanje koncentracijo NEFA v obporodnem obdobju. Sproščanje NEFA v tem času je bistveno za presnovo perifernega tkiva, vendar lahko prekomerna mobilizacija maščob povzroči povišane ravni ketonov in njihove zdravstvene posledice v poporodnem obdobju.

Rezultati naše raziskave kažejo na pojav pomembnih sprememb parametrov oksidativnega stresa in antioksidativnega statusa krav molznic. Zdi se, da imajo krave molznice izrazitejši oksidativni stres in nizko antioksidativno obrambno sposobnost takoj po porodu ali med zgodnjo laktacijo v primerjavi s kravami v kasnejši brejosti, kar lahko prispeva k pojavnosti številnih presnovnih bolezni. Zato lahko redno spremljanje antioksidativne obrambe in dodajanje antioksidantov pomaga zmanjšati pojavnost teh bolezni pri kravah v obporodnem obdobju. Naši rezultati potrjujejo, da lahko dodajanje vitaminov in mikroelementov vpliva na značilne presnovne spremembe, ki se pojavijo med začetkom in vrhom laktacije.

S hipotezo smo preverjali, ali lahko s tretiranjem z antioksidanti vplivamo na stanje metabolnega in oksidativnega stresa, zato smo pričakovali razlike v stopnji negativne energijske bilance (razlike v koncentraciji metabolitov NEFA in BHB) ter indikatorjev oksidativnega stresa (SOD, GPX, vit. E, Se, TAS) med tretiranimi in netretiranimi kravami. Rezultati kažejo, da je dodatek vit. AD_3E in Se učinkovito blažil učinke metabolnega in oksidativnega stresa ter pomagal nevtralizirati veliko količino ROS, ki nastajajo ob porodu ter stresu pri laktaciji in patofizioloških stanjih. V raziskavi smo uspeli dokazati, da lahko s preventivnimi ukrepi, kot je dodajanje vitaminov in mineralov, blažimo učinke oksidativnega stresa in krepimo sposobnost organizma za boljše odstranjevanje ROS in izboljšujemo energijski status goveda. Z različnimi načini in metodami si prizadevamo, da bi zmanjševali in preprečevali oslabljeno zdravstveno stanje, bolezni in reprodukcijske motnje v mlečnih čredah, ki so posledica oksidativnega, vročinskega in metabolnega stresa, saj ne predstavljajo samo dodatnega stroška zaradi zdravljenja, ampak tudi gospodarske izgube zaradi zmanjšane količine pridelanega mleka. Dodajanje Se in vit. E se je izkazalo kot učinkovit preventivni ukrep.

5.4 ANALIZA PLODNOSTI

Spremljanje in analiza parametrov plodnosti v čredi krav molznic ter posredovanje in zdravljenje, če je to potrebno, so neposredno povezani s prirejo mleka in gospodarskim donosom kmetije.

Primerjava vrednosti plodnostnih parametrov (tabela 5) kaže statistično pomembno razliko med skupinama v uspešnosti prve osemenitve ($p = 0,042$), dolžini SI ($p = 0,035$), PP ($p = 0,044$) in DMT ($p = 0,039$) ter IUO ($p = 0,046$) v prid tretirani skupini krav. Tudi ostale povprečne vrednosti parametrov plodnosti so numerično boljše v tretirani skupini, a statistično pomembnih razlik ni bilo.

Pri tretirani skupini živali smo zabeležili 56 % uspešnost prve osemenitve v primerjavi s kontrolno skupino, kjer je bila uspešnost 44 %. Pri vsaki naslednji osemenitvi razlike niso bile statistično značilne. Rezultati so skladni z Arechiga in sod. (1994), ki so ugotovili, da je tretiranje s kombinacijo vit. E in Se 21 dni pred pričakovano telitvijo povečala stopnjo uspešnosti prve osemenitve. Pri tretirani skupini smo zabeležili pomembno krajšo povprečno dolžino SI, in sicer 43,81 dni, v primerjavi s kontrolno 49,67 dni. Tudi v raziskavi Campbella in Millerja (1998) se je dodatek kombinacije vit. E in Se v odmerku 1000 IE/dan v zadnjih 42 dneh pred porodom izkazal kot učinkovit za skrajšanje trajanja SI. IUO pri tretiranih kravah je znašal 1,81 v primerjavi s kontrolno skupino krav, kjer je bil IUO 2,06.

Različni avtorji (Radostits in sod., 1994; Pipan, 1991; Opsomer in sod., 2004) navajajo, da je optimalno trajanje PP okrog 85 dni, da s tem dosežemo DMT 365 in posledično eno telitev na leto. Rezultati kažejo, da smo to dosegli pri obeh skupinah kljub visoki mlečnosti krav. PP je bil pomembno krajši v tretirani skupini (PP = 60,88 dni) v primerjavi s kontrolno (PP = 71,83 dni). Daljši SI pri kontrolni skupini so lahko posledica kasnejše ovulacije, še bolj verjetno pa dejstva, da smo v tej skupini zabeležili pomembno več RM, ki so večinoma zahtevale zdravljenje, zato smo prvo osemenitev pri teh kravah opravili šele 60. dan po porodu ali celo kasneje. Daljši PP v kontrolni skupini je skladno z ugotovitvami preteklih študij (Radostits in sod., 1994; Pipan, 1991; Opsomer in sod., 2004) povezan z daljšim SI v tej skupini, slabšo uspešnostjo osemenitve, NEB in boleznimi ter RM, ki so posledica NEB.

Orešnik (1995) navaja, da se prva osemenitev opravi okrog 50. dne po porodu, saj da ima prekratek SI za posledico odstotek uspešnosti, ki je slabši od 50 %. Čeprav smo večino prvih osemenitev pri kravah brez RM opravili cca. 40. dan po porodu, smo dosegali visoke odstotke

uspešnosti, v tretirani skupini celo 56 %. Pri mlečnih pasmah je optimalno, da DMT traja 365 dni ali manj (Orešnik, 1995). Kot je razvidno iz Tabele 5, smo to dosegli pri obeh skupinah krav (DMT kontrolna skupina = 356,83 dni; DMT tretirana skupina = 345,88 dni). Vse našteto kaže na boljšo reprodukcijsko sposobnost tretirane skupine v primerjavi s kontrolno skupino krav, kar posledično pomeni manjšo porabo semena oz. manj stroškov osemenjevanja, krajšo DMT in večjo prirejo mleko.

Ne glede na to, ali so bile krave razvrščene v kontrolno ali tretirano skupino, rezultati raziskave kažejo na ugodne oz. zelo dobre reprodukcijske parametre za celotno visoko produktivno čredo molznic, kar je verjetno posledica dobre tehnologije reje in optimalne prehrane, zaradi katere so pokrite potrebe bo vitaminih, mineralih in energiji. Vse živali na kmetiji so bile zaradi optimalne oskrbe manj podvržene izraziti NEB, ki ima nadalje manjše negativne učinke na parametre plodnosti. Upravičeno lahko zaključimo, da smo kljub visoki produkciji mleka po telitvi s preventivnim dodajanjem Se in kombinacije vit. AD$_3$E še dodatno pripomogli k temu, da krave niso zapadle v NEB. Poporodna anestrija zato ni bila podaljšana in so krave prej vzpostavile normalen ciklus, s čimer smo dosegli hitrejšo osemenitev, skrajšanje časa med dvema telitvama in ekonomsko bolj upravičeno prirejo mleka.

5.5 PLODNOSTNE MOTNJE

Znano je, da sta oksidativni in metabolni stres v obporodnem obdobju pomembna dejavnika, ki prispevata k povečani dovzetnosti krav za bolezni, kot so endometritis, ovarialne ciste, zaostala posteljica, tihe pojatve in težave v involuciji maternice (Kankofer, 2000; Harrison in sod., 1984). Z našo raziskavo smo poskušali ugotoviti oz. potrditi, da je dodajanje kombinacije vit. AD$_3$E in Se pozitivno povezano z zmanjšanjem pojava RM pri tretirani skupini. Že Harrison in sod. (1984) so v raziskavi ugotovili, da sta injiciranje Se in peroralni dodatek vit. E pred porodom povezana z nižjo pojavnostjo zaostale posteljice, endometritisa in cist na jajčnikih. Rezultati kažejo, da je bilo v tretirani skupini krav statistično značilno manj krav z eno ali več RM v primerjavi s kontrolno skupino (tabela 6). V kontrolni skupini smo zabeležili RM pri sedmih kravah, od tega so bile tri, pri katerih smo v poporodnem obdobju zabeležili skupaj tri različne RM; tri, pri katerih smo zabeležili dve različni RM; ter ena krava z eno RM. V tretirani skupini smo diagnozo ene ali več RM postavili pri štirih kravah; od tega smo pri eni kravi diagnosticirali tri različne RM, pri ostalih treh kravah pa po eno RM. Kot smo predhodno že potrdili, smo s tretiranjem uspeli zmanjšati metabolni in oksidativni stres. Naši rezultati

potrjujejo, da smo posredno vplivali tudi na manjšo verjetnost pojava RM.

Zanimalo nas je, pri katerih parametrih oksidativnega in metabolnega stresa je prišlo do statistično pomembne razlike glede na to, ali smo pri kravi diagnosticirali katero izmed RM ali ne. Krave smo razdelili v dve skupini ne glede na to, v katero skupino so bile sicer vključene med raziskavo (tabela 8). Primerjava vrednosti TAS, GPX in SOD, koncentracije vit. E in Se ter vrednosti BHB in NEFA v krvni plazmi med skupino krav z eno ali več RM in zdravo kontrolno skupino krav nakazuje pomembno višje vrednosti kazalnikov oksidativnega in metabolnega stresa ter zmanjšanje antioksidantov pri kravah s katerokoli RM v primerjavi s kravami, pri katerih nismo zabeležili bolezni. Ob vzorčenju 14 dni po porodu je razlika statistično značilna pri vseh merjenih parametrih, 28 dni po porodu pa pri vseh parametrih, razen pri SOD.

5.5.1 Vnetje maternice

Lumen maternice je po telitvi kontaminiran z bakterijami, kar lahko povzroči okužbo, zato imunski odziv pomembno vpliva na razvoj bolezni maternice. Odkrivanje endometritisa pri kravah temelji na rektalnem ultrazvočnem pregledu (Kasimanickam in sod., 2004). Diagnozo endometritisa smo postavili, ko je pregled pokazal povečano velikost maternice, odebeljeno maternično steno ter povečan tonus maternice, ob katerem je bil prisoten izcedek različne barve in konsistence.

Diagnozo endometritisa smo postavili pri štirih kravah od osemnajstih (22 %) iz kontrolne skupine ter pri eni kravi od šestnajstih (6 %) v tretirani skupini. Razlika v pogostosti pojava te RM med skupinama je bila statistično značilna. Odstotek pojavnosti v kontrolni skupini potrjuje navedbe Sheldona in sod. (2006 in 2009), da se endometritis pojavi pri 15 do 20 % vseh krav v obdobju treh tednov ali več po porodu zaradi vztrajne bakterijske rasti. V tretirani skupini je bil odstotek veliko nižji, kar kaže na učinek tretiranja. Endometritis se pogosto pojavi v kombinaciji z drugimi RM (Lewis, 1997; Sheldon in sod., 2006), kar je razvidno tudi iz naših rezultatov. Iz tabele 7, v kateri so podatki o sopojavnost RM, lahko razberemo, da smo poleg endometritisa pri petih kravah diagnosticirali še tiho pojatev, pri treh ovarialne ciste ter pri eni zaostalo posteljico.

Koeficienti korelacije med pojavom endometritisa in merjenimi parametri antioksidativne zaščite, metabolnega in oksidativnega stresa (tabela 10) pri tretjem (14 dni po porodu) in četrtem (28 dni po porodu) vzorčenju kažejo visoke statistično pomembne povezanosti z

nekaterimi merjenimi parametri. 14 dni po porodu se je pojav endometritisa visoko negativno povezoval z nižjimi vrednostmi TAS (r = -0,489*, p ≤ 0,01*), nižjo plazemsko koncentracijo vit. E (r = -0,457*, p ≤ 0,01*) in Se (r = -0,347*, p ≤ 0,05*) ter zmanjšano aktivnostjo SOD (r = -0,512*, p ≤ 0,01*) in GPX (r = -0,474*, p ≤ 0,01*). 28 dni po porodu so bile statistično pomembno in visoko negativne povezanosti z nižjo plazemsko koncentracijo vit. E (r = -0,492*, p ≤ 0,01*) ter zmanjšano aktivnostjo SOD (r = -0,519*, p ≤ 0,01*) in GPX (r = -0,468*, p ≤ 0,01*). Na podlagi rezultatov torej zaključimo, da je večja verjetnost pojava endometritisa pri kravah z nižjo plazemsko koncentracijo TAS, nižjo koncentracijo vit. E in Se, zmanjšano aktivnostjo GPX in SOD. Tudi Kizil in sod. (2010) so pri kravah s puerperalnim endometritisom v primerjavi s kontrolno (zdravo) skupino krav ugotovili zmanjšano povprečno koncentracijo TAS, znatno zmanjšano koncentracijo vit. E ter nižje vrednosti Se in zmanjšano aktivnosti GPX. Izsledki nakazujejo na moten antioksidativni sistem in pospeševanje peroksidacijskih reakcij pri kravah s puerperalnim endometritisom. Zmanjšana aktivnost GPX pri kravah z akutnim puerperalnim endometritisom v primerjavi s kontrolno skupino je povezana z intenzivnejšo peroksidacijo lipidov ter slabšo zmožnostjo odstranjevanja ROS, čemur sledi poslabšanje zdravstvenega stanja in večji učinek oksidativnega stresa. Višji oksidativni stres pri kontrolni skupini krav je prispeval k nenormalnemu vnetnemu odzivu po porodu (Sordillo in Aitken, 2008) in večji verjetnosti pojava endometritisa.

Nezadostni energijski vnos v obporodnem obdobju pri kravah molznicah povzroči povečanje koncentracij NEFA kot odziv na mobilizacijo maščob (LeBlanc, 2010a). Z določanjem korelacij med presnovnim profilom (NEFA, BHB) in pojavom endometritisa smo poskusili oceniti povezanost ter ugotovili, da se endometritis visoko pozitivno povezuje z višjimi vrednostmi NEFA 14 dni po porodu (r = 0,549*, p ≤ 0,01*) ter 28 dni po porodu (r = 0,446*, p ≤ 0,001*). Vrednost BHB se ni izkazala za statistično pomembno povezano. Krave, ki so imele 14 in 28 dni po porodu slabšo energijsko bilanco, so bile torej bolj dovzetne za endometritis. Rezultati potrjujejo, da visoka serumska koncentracija NEFA predstavlja dejavnik tveganja za poporodne vnetne bolezni pri kravah molznicah (Goff, 2006; Gautam in sod., 2009; Bernabucci in sod., 2005), kar se je pokazalo tudi v naši raziskavi.

5.5.2 Zaostala posteljica

Normalno je, da krave izločijo posteljico oz. plodove ovojnice v treh do osmih urah po porodu. Če do tega ne pride v 24 urah ali kasneje ter hkrati opazimo zaostali del plodovih ovojnic, ki

visijo iz vulve, lahko govorimo o pojavu zaostale posteljice (RS). LeBlanc (2010b) navaja, da je ta pojav pogostejši pri kravah mlečnih pasem (5 do 15 % pojavnost), ki so presnovno bolj obremenjene. Rezultati (tabela 6) kažejo, da smo diagnozo RS postavili pri treh kravah (17 %) iz kontrolne skupine. V tretirani skupini krav do RS ni prišlo. Razlika med skupinama je statistično značilna. Rezultati so zelo podobni kot v raziskavi Harrison in sod. (1984), kjer so zabeležili RS pri 16 % krav, ki niso prejemale dodatka vit. E in Se; pri kravah, ki so prejele omenjen dodatek, do pojava RS ni prišlo. Izračun korelacij med pokazatelji oksidativnega in metabolnega stresa ter pojavom RS (tabela 10) kaže visoko statistično pomembno negativno povezanost med pojavom RS in TAS, vit. E, Se, SOD in GPX ter visoko statistično pozitivno povezanost s koncentracijo NEFA in BHB 14 in 28 dni po porodu. Zelo podobne izsledke raziskave so zabeležili Bionaz in sod. (2007), ki poročajo, da se zmanjšane koncentracije vit. A, E in kalcija, zmanjšana vrednosti TAS ter povečane koncentracije NEFA in BHB povezuje z diagnozo RS.

V prvem delu razprave smo že ugotovili, da se je tretiranje živali s Se in kombinacijo vit. AD$_3$E izkazalo za učinkovito za blaženje oksidativnega in metabolnega stresa, ki se povezujeta s pojavom RS (Kendall in Bone, 2006), zato lahko upravičeno zaključimo, da je preventivno dodajanje antioksidantov smiselno za zmanjševanje pojava RS v čredi. Ugotovitve so skladne s študijo Pontesa in sod. (2014), kjer je dodajanje vit. E in Se v predporodnem obdobju prav tako vplivalo na zmanjšano incidenco RS pri kravah molznicah.

5.5.3 Tiha pojatev (subestrus)

Gospodarska donosnost prireje mleka je tesno povezana z reprodukcijo. Morebitna izostala pojatev pri kravi zmanjša njeno prirejo mleka v dneh laktacije. Izostanek pojatve do 60. dne po porodu velja za patološko stanje in v polovici primerov gre za tiho pojatev (Yamauchi in sod., 2002). Iz tabele 6 je razvidno, da smo tiho pojatev oz. odsotnost značilnih zunanjih znakov pojatve v pričakovanem obdobju 60 dni po porodu s pomočjo rektalnega pregleda ter računalniškega spremljanja živali diagnosticirali pri štirih kravah iz kontrolne skupine in treh kravah iz poskusne skupine. Razlika v incidenci te RM med skupinama ni bila statistično značilna. Od vseh spremljanih RM je bilo teh v tretirani skupini največ. Tudi skupno gledano je bilo teh RM pri vseh živalih relativno veliko (sedem krav od 34 oz. diagnoza pri 21 % vseh živali vključenih v raziskavo). Razlog je mogoče iskati v učinku vročinskega stresa, saj ima le-ta negativnem vpliv na izraženost pojatve krav, zato lahko govorimo o t. i. poletni anestriji

(Khan in sod., 2015). Vročinski stres povzroči povečano izločanje kortizola, ki zavira znake pojatve. Poleg tega je zmanjšana telesna aktivnost verjetno tudi prilagoditveni odziv, ki omejuje proizvodnjo toplote in zmanjšano pojatveno vedenje. Visok delež tihih pojatev je verjetno povezan tudi z visoko mlečno proizvodnjo, saj zaradi višje mlečnosti in povečanega pretoka krvi skozi jetra prihaja do znižanja koncentracije steroidnih hormonov, predvsem progesterona in estrogena v krvi (Lopez in sod., 2004). Ker je čreda, iz katere smo izbrali živali za raziskavo, opremljena z ovratnicami za računalniško spremljanje gibanja in dnevne mlečnosti (opravlja se tudi analiza prevodnosti mleka), je uspešnost odkrivanja tihih pojatev visoka.

5.5.4 Cistično obolenje jajčnikov

Cistično obolenje jajčnikov oz. COD smo določili ob prisotnosti anovulatornega folikla s premerom več kot 17 mm (22 mm), ki je perzistiral več kot šest dni (10 dni), ko ni bilo prisotnega funkcionalnega rumenega telesa ter ob prisotnosti nenormalnih znakov pojatve (anestrus, nimfomanija, nenormalna cikličnost). Iz tabele 6 je razvidno, da smo diagnozo te RM postavili pri petih kravah iz kontrolne skupine (28 %) ter pri dveh kravah iz tretirane skupine (13 %). Razlika v pogostosti te RM med skupinama je bila statistično značilna. Pogostost pojavljanja COD v kontrolni skupini je v skladu z navedbami različnih avtorjev (Bors in Bors, 2020; Day, 1991; Lopez-Diaz in Bosu, 1992), in sicer se pojavnost giblje od 20 % do 30 %. Od skupaj sedmih primerov COD smo zdravili tri; ostale so spontano izginile. Tudi Day (1991) ter Lopez-Diaz in Bosu (1992) navajajo, da tudi do 60 % cist spontano izgine. Iz tabele 7 je razvidno, da se je COD samo v enem primeru pojavil kot edina RM, pri vseh drugih pa skupaj s katero drugo motnjo. Najpogosteje, v treh primerih skupaj, smo ugotovili sopojavnost skupaj z endometritisom in tiho pojatvijo; v dveh primerih se je COD pojavila skupaj z zaostalo posteljico. Tudi Bors in Bors (2020) ter López-Gatius in sod. (2002) navajajo, da se COD pogosto pojavlja skupaj z drugimi RM, saj so po njihovih navedbah zaostala posteljica, metritis in ketoza dejavniki tveganja za razvoj cist na jajčnikih. Čeprav so bili številni dejavniki tveganja povezani z verjetnostjo za nastanek cist na jajčnikih, večina študij prepoznava visoko mlečnost in posledično NEB kot najpomembnejšega (Bors in Bors, 2020). V tabeli 10 so prikazani korelacijski koeficienti statistične povezanosti med vrednostmi TAS, vit. E., Se, NEFA, BHB, SOD in GPX ob tretjem in četrtem vzorčenju ter incidenco COD. Kot statistično pomembni so se 14 dni po porodu izkazali ravno koeficienti korelacije med COD in NEFA ($r = 0{,}350$; $p \leq 0{,}05$) ter COD in BHB ($r = 0{,}462$, $p \leq 0{,}05$); prav tako je bila statistično značilna povezanost med COD in parametri NEB 28 dni p. p. (COD in NEFA ($r = 0{,}632$; $p \leq 0{,}05$) ter COD in BHB

(r = 0,475*, p ≤ 0,05*). Rezultati naše raziskave potrjujejo, da je NEB pomembnem dejavnik tveganja za nastanek COD. Kot statistično pomembne in negativne povezanosti med COD in drugimi merjenimi parametri so se 14 dni po porodu izkazale še vrednosti TAS (r = -0,405*; p ≤ 0,05*) in koncentracija vit. E (r= -0,390*; p ≤ 0,05*). Prav tako je bila koncentracija vit. E pomembno in negativno povezana s pojavom COD (r = -0,565*; p ≤ 0,05*) še 28 dni po porodu V uvodu razprave smo že ugotovili, da smo z dodajanjem kombinacije Se in vit. AD_3E zmanjšali NEB v tretirani skupini, s čimer smo očitno posredno vplivali tudi na pojav COD v tej skupini krav.

5.5.5 Motnje v involuciji maternice

Involucija maternice po telitvi je kompleksen proces, ki vključuje fizično krčenje maternice, nekrozo, luščenje površine karunkul in regeneracijo endometrija. Avtorji (Kaidi in sod, 1991, Hussein in Daniel, 1991; Kamimura in sod., 1993; Williams in sod., 1995; Leslie, 1983; Čengić in sod., 2012) navajajo različne podatke o času, potrebnem za popolno involucijo maternice, vse od 15 do 60 dni. V naši raziskavi smo uporabili enak kriterij kot Kamimura in sod., (1993) ter Podpečan (2005) in involucijo opredelili kot zaključeno takrat, ko se ultrazvočno merjena premera obeh rogov med dvema pregledoma nista več spreminjala. Ultrazvočne preglede smo opravljali na sedem dni, zato smo krave razvrstili v tri obdobja po porodu, v katerih je bila involucija zaključena. Hitrost involucijskih procesov v maternici je bila pri obeh proučevanih skupinah najbolj izražena prve tri tedne po porodu (tabela 9). Pri 17 oz. 50 % vseh krav je bila involucija zaključena do 21. dne po porodu. Primerjava tretirane in kontrolne skupine za to obdobje (14-21 po porodu) je pokazala statistično pomembno razliko, saj je bila involucija zaključena pri 62,5 % tretiranih krav in pri 38,9 % netretiranih. V drugem (22-28 dni po porodu) in tretjem (29-35 dni po porodu) intervalu razlika med skupinama v številu zaključenih involucij ni bila statistično značilna. Velja omeniti, da so vse krave v tretirani skupini involucijo zaključile do 28. dne po porodu, medtem ko sta dve kravi iz kontrolne skupine potrebovali več kot 28 dni. Pri tretiranih kravah smo 14 in 28 dni po porodu ugotovili boljši metabolni in oksidativni status, ki vplivata na dolžino involucije (Grummer in sod, 2004). Torej je bilo tretiranje učinkovito in je pripomoglo k hitrejšemu poteku involucije. Čas, potreben za involucijo, je bil pri vseh živalih vključenih v raziskavo sicer znotraj okvirjev, ki jih navajajo zgoraj omenjeni avtorji (od 15 do 60 dni), vendar veliko krajši od zgornje meje, kar je verjetno povezano z dejstvom, da gre za krave molznice, pri katerih se je v različnih raziskavah (Leslie, 1983; Čengić in sod., 2012; Podpečan, 2005) že izkazalo, da je involucija zaključena prej, pri

večini živali do 35. dne.

Dejansko je bila zmanjšana celična imunost povezana z boleznimi, kot so RS, endometritis, COD in motnje v involuciji maternice, zato ni presenetljivo, da se približno 75 % pojavnosti bolezni (mastitis, endometritis, ketoza, zaostala posteljica …) znotraj čred pojavi v prvem mesecu laktacije (LeBlanc in sod., 2004). V tem obdobju (v prvih desetih dneh po telitvi), ki sovpada z najbolj intenzivno laktacijo, so krave podvržene največjemu tveganju za nalezljive in presnovne motnje ter bolezni, ker je metabolni in oksidativni stres najbolj izrazit. Zraven antioksidativnih in imunsko-regulacijskih lastnosti ima vit. E tudi bistveno vlogo pri presnovi, ki je kritičen dejavnik v obdobju telitve in izpostavlja molznice oksidativnemu stresu ter posledično okužbam (Dubuc in sod., 2010; Kimura in sod., 2002). Pretekle raziskave (Bouwstra in sod., 2010; Pontes in sod., 2014; Allison in sod., 2000; Eger in sod., 1985; Santos in sod. 2010) so dokazale, da je oksidativni stres visoko pomembno povezan z incidenco RM, predvsem RS, ter težavami s plodnostjo. Rezultati kažejo, da je preventivno dodajanje in oskrba živali z vit. E in Se, posredno preko zmanjševanja oksidativnega in metabolnega stresa, zmanjšalo incidenco RM (ovarialne ciste, RS in endometritis) ter izboljšalo splošno reprodukcijsko zmogljivost krav. Kombinacija vitamina AD_3E in Se se je izkazala kot dober vir za krepitev antioksidativne zaščite organizma. Iz literature so znani pozitivni učinki vit. E, ob tem pa ne smemo zanemariti pozitivnih in koristnih lastnosti vitaminov A in D na zdravje in reprodukcijske parametre. Na našem vzorcu smo uspeli dokazati statistično pomembne razlike v plodnostih parametrih in incidenci nekaterih RM med kravami, ki so prejemale dodatek mikroelementa Se in kombinacijo vitaminov AD_3E, vendar je potrebno zaključke previdno interpretirati. Razlogov za to je več; eden je zagotovo majhno število krav, vključenih v vzorca. Rezultate majhnih skupin je težje statistično vrednotiti, saj imajo velik vpliv individualne razlike med živalmi, ki imajo nadalje velik vpliv na skupne kazalce. Da bomo lahko z večjo zanesljivostjo trdili, da je dodajanje Se in vit. E smiselno, bodo potrebne še nadaljnje raziskave na večjem številu krav, bolj raznolikih vzorcih (večji starostni razpon krav), tretiranje v različnih letnih časih. Da bi lahko razločili učinek Se in vit. E, bi bila potrebna razvrstitev krav v več poskusnih skupin in tretiranje samo z vit. E, samo s Se in skupaj s kombinacijo obojega ter primerjava vrednosti.

5.6 ODNOS MED PARAMETRI FF IN KRVNE PLAZME

Predpostavili smo, da obstaja povezava med koncentracijo ROS v FF in krvni plazmi. Znano

je, da je FF v foliklu ločena od perifolikularnega tkiva s folikularno steno, ki predstavlja krvno-folikularno bariero (Badinga in sod., 1993). To tekočino sestavljajo produkti lokalno proizvedenih snovi folikla, ki so povezane s presnovno aktivnostjo folikularnih celic, in deloma tudi eksudat krvne plazme. Z merjenjem koncentracije TAS, Se in vit. E v krvni plazmi in FF smo želeli ugotoviti, ali obstaja povezava med njimi.

V tabeli 4 so prikazane povprečne vrednosti TAS ter povprečna koncentracija vit. E in Se v FF za kontrolno in tretirano skupino. Razlika v poprečnih vrednostih TAS med skupinama ni bila statistično pomembna. Toda analize so po pričakovanjih pokazale statistično pomembno višjo koncentracijo vit. E in Se v FF pri tretirani skupini.

Visoko pozitivni in statistično pomembni korelacijski koeficienti statistične povezanosti med vrednostmi TAS, vit. E in Se v krni plazmi in FF (tabela 11) kažejo, da obstaja povezava med koncentracijo merjenih parametrov v FF in krvni plazmi. Presnovne spremembe v krvnem serumu so se tako odražale tudi v biokemični sestavi FF (Abd Ellah in sod., 2010; Armstrong in sod., 2003).

Izračunali smo tudi korelacijske koeficiente med vrednostmi TAS, vit. E in Se v FF in vrednostmi NEFA, BHB, SOD in GPX v krvni plazmi (tabela 11). Na podlagi rezultatov vidimo negativno povezanost med merjenimi parametri v FF in indikatorji NEB v krvni plazmi ter visoko pozitivne povezanosti z biomarkerji antioksidativne zaščite pred oksidativnim stresom. Preventivno dodajanje Se in vit. AD_3E je imelo pozitiven učinek tudi na zmanjšanje oksidativnega stresa oz. povečanje obrambe pred ROS tudi v FF. Ker FF zagotavlja mikrookolje za razvoj, rast in zorenje jajčnih celic in je ključnega pomena za vzdrževanje plodnosti pri samicah (Kalmath in sod, 2007; Gosden in sod., 1988) smo z izboljšanjem biokemičnih značilnosti FF pri tretirani skupini prispevali k izboljšanju kakovosti jajčec in posledično sposobnosti za dosego oploditve ter razvoja zarodka. Glede na to, da smo raziskavo opravljali poleti in da so meritve temperature in zračne vlažnosti (tabela 1) pokazale, da je pri živalih, vključenih v raziskavo, najverjetneje nastopil vročinski stres, saj se lahko pri visoki vlažnosti vročinski stres pojavi že pri temperaturah nad 20 ºC; temperatura 25 ºC je pogosto omenjena kot kritična (Ratiznojnik, 2018). Maksimalna zunanja temperatura v času raziskave je bila 37,2 °C, minimalna 17,3 °C, povprečna temperatura ob 10 h 22,1 °C, ob 14 h 24,5 °C ter ob 18 h 23,5 °C, zato lahko glede na naše meritve temperatur zaključimo, da so bile živali pod vročinskim stresom. Kot posledica vročinskega stresa je nastopil oksidativni stres, za katerega

vemo, da ima pomemben negativni vpliv na plodnost. Dodajanje Se in kombinacije vit. AD_3E se je izkazalo kot učinkovita preventiva reprodukcijskih motenj.

5.7 PRENOS ZARODKA

V naši raziskavi smo želeli preveriti, ali se preventivno dodajanje vit. E in Se povezuje tudi z uspešnostjo ET pri telicah, in sicer smo ugotavljali razlike v implantacijski sposobnosti med telicami, ki smo jih tretirali s Se in kombinacijo vit. AD_3E, in netretiranimi telicami. Ob prenosu zarodka smo obema skupinama vzeli vzorec krvi in analizirali vrednosti vit. E, Se, TAS in NEFA v krvni plazmi.

Dokazali smo pozitiven vpliv tretiranja; dodajanje vit. E in Se se je izkazalo kot uspešno, saj so vrednosti vit. E in Se v krvni plazmi pomembno in visoko višje pri treniranih telicah (tabela 12). Rezultati kažejo, da je imela kontrolna skupina telic razmeroma nizke, skoraj prenizke vrednosti vit. E (2, 76 µg/mL) in Se (104,65 µg/mL) v krvni plazmi. Koncentracije vit. E višje od 3,5 µg/mL so zadostne, med 2,5 in 3,5 µg/mL mejne, nižje od 2,5 µg/mL pa prenizke (Wolf in sod., 1998); koncentracije Se, ki so pod 120 µg/mL so prenizke; optimalne se gibljejo nad 200 µg/ml (Juniper in sod., 2006). Visoko pozitiven odziv na tretiranje je verjetno povezan s pomanjkanjem tega dvojega, zato so ob dodajanju vrednosti hitro narasle.

Raziskavo smo opravljali v poletnih mesecih, zato smo predpostavljali, da bo kot posledica visoke okoljske temperature pri telicah nastopil vročinski stres ter da bo zaradi porušenega ravnovesja med nastajanjem in varnim odstranjevanjem prostih radikalov nastopil oksidativni stres. Posledice porušenega ravnovesja med oksidanti in antioksidanti smo poskušali kompenzirati z dodajanjem vit. E in Se. Rezultati kažejo, da sta se v kombinaciji izkazala kot dobra antioksidanta, ki izboljšujeta splošno zdravje krav in reprodukcijske sposobnosti. Oksidativni stres smo določali posredno, preko parametra TAS. Rezultati so pokazali pomembne razlike v vrednosti tega parametra med kontrolno skupino in skupino telic, ki smo ji dodajali vitamin AD_3E in Se, kar je skladno s predhodnimi raziskavami (Brzezinska-Slebodzinska in sod., 1994; Allison in Laven, 2000; Smith in sod., 1984; Weiss in sod., 1997), v katerih so dokazali, da imata ključni pomen pri odstranjevanju ROS iz telesa. Vit. E je kot močan antioksidant vključen v številne fiziološke procese; njegovo pomanjkanje je povezano z dvigom koncentracije ROS, poškodbami celic in posledično s poškodbami različnih tkiv (Jain in sod., 1988; Passi in sod., 1991; Kökçam in Naziroğlu, 1999; Briganti in Picardo, 2003); Se

je prav tako vpleten v antioksidativno obrambo celotnega organizma, saj se kot lovilec prostih radikalov vključuje v obrambo pred oksidativnim stresom (Chauhan in sod., 2014). Z dodajanjem antioksidantov smo ugodno vplivali na sposobnost celic za nevtraliziranje in razstrupljanje škodljivih posledic prostih radikalov; dodajanje vit. E in Se je ugodno vplivalo na spremembo aktivnosti antioksidantnih encimov.

Še en dejavnik, ki kaže v prid temu, da smo s tretiranjem blažili posledice vročinskega stresa na telice, je pomembno boljša energijska bilanca pri skupini tretiranih telic. V krvni plazmi netretiranih telic smo ugotovili statistično višjo koncentracijo NEFA, ki kaže na slabše energijsko stanje. Ta rezultat lahko pripišemo kombinaciji vit. E in Se glede na to, da so imele vse telice sicer enake pogoje (enaka krmna mešanica in isti pogoji reje). S pomočjo dodajanja vit. E in Se smo uspeli ublažiti negativni efekt slabše energijske bilance na plodnost živali.

Primerjava števila uspelih implantacij zarodkov med kontrolno in tretirano skupino v naši raziskavi kaže v prid slednje, saj je v tej skupini 64,7 % telic ostalo brejih po prenosu zarodka ter donosilo zdrava teleta. V kontrolni skupini je bila implantacija uspešna v 41,2 %. V raziskavi smo dokazali, da lahko s preventivnim dodajanjem antioksidantov zmanjšamo posledice vročinskega stresa, pozitivno vplivamo na reprodukcijske parametre in povečamo uspešnost ET. Vročinski stres poruši hormonsko ravnovesje, saj vpliva zaviralno na tvorjenje progesterona, ki je nujno potreben za vzdrževanje gravidnosti, zato sklepamo, da smo s tretiranjem telic ugodno vplivali na koncentracijo tega hormona in s tem pripomogli, da so se zarodki obdržali v maternici telic prejemnic. S tem, ko smo zmanjševali učinke vročinskega stresa, smo zmanjševali tudi koncentracije stresnega hormona kortizola, ki je pri kontrolni skupini v večji meri vplival na to, da se presajeni zarodki niso ugnezdili.

Naredili smo tudi primerjavo koncentracij vit. E in Se ter vrednosti TAS in NEFA med skupino telic, ki so po prenosu zarodka ostale breje, in skupino telic, pri katerih je bil prenos neuspešen. Pri vseh parametrih so bile razlike statistično pomembne. Koncentracija vit. E in Se v krvni plazmi brejih telic je bila pomembno višja. Telice, ki so po prenosu ostale breje, so imele pomembno višji TAS ter boljšo energijsko bilanco. Ti podatki so še en dokaz, da je imelo dodajanje vit. E in Se pozitiven učinek na plodnost oz. sposobnost telic, da je prišlo do uspešne implantacije zarodka.

ET je v govedoreji relativno nova biotehnološka metoda reprodukcije, ki pa se vse bolj uveljavlja kot alternativni način reprodukcije, s katerim lahko zagotovimo prenos najboljšega

oz. izbranega genetskega materiala na potomce. Ker je to področje relativno novo, je tudi malo že opravljenih raziskav, zato so vsa spoznanja, kako lahko pripomoremo k uspehu ET, toliko bolj pomembna. Izsledki naše raziskave so pomembni na področju preventive, torej kako predhodno dobro pripraviti telice/krave prejemnice na prenos zarodka, da pri tem pripomoremo k uspešnejši ugnezditvi zarodka. Verjetno bo ta način reprodukcije postal še bolj pomemben ravno zato, ker lahko za razplod uporabimo tudi telice, ki ne nosijo najboljšega genetskega materiala, a so v dobri telesni kondiciji in zdrave v reprodukcijskem smislu. Na podlagi odvzema vzorca krvne plazme in analizi stanja parametrov metabolnega in oksidativnega stresa ter koncentracije antioksidantov lahko telice/krave predhodno pripravimo na postopke asistirane reprodukcije (umetno osemenitev in presajanje zarodka) ter tako optimiziramo uspešnost postopka. Glede na to, da so bile vse živali vključene v našo raziskavo sicer izpostavljene enakim klimatskim, rejnim in prehranskim pogojem, lahko dobljene razlike pripišemo učinkom preventivnega dodajanja Se in kombinaciji vitaminov AD_3E.

Z nadaljnjimi raziskavami, napredkom in širšo uporabo ET bomo lahko zagotavljali generacije živali z najboljšimi proizvodnimi lastnostmi, povečali proizvodnjo mleka, mesa in drugih izdelkov. Kot drugo pomembno dodano vrednost uporabe ET v živalskem svetu pa bo ta metoda reprodukcije omogočala ohranjanje redkih in avtohtonih pasem živali.

Naša raziskava je temelj za nadaljnje raziskave, saj lahko na podlagi naših rezultatov razmišljamo v smeri k uveljavitvi rednega spremljanja antioksidantnega statusa v čredi in dodajanju v primeru pomanjkanja.

6 SKLEPI

- V poporodnem obdobju visokoproduktivnih krav pride do izrazitega povečanja oksidativnega in metabolnega stresa kot posledica visokih presnovnih zahtev po porodu ter visoke proizvodnja mleka.
- Dodatek Se in kombinacije vit. AD$_3$E je smiseln za zviševanje koncentracije Se in vit. E v krvni plazmi in posledično izboljšanje antioksidativne zaščite.
- Dodatek Se in kombinacije vit. AD$_3$E je učinkovita podpora k delovanju antioksidantnega obrambnega sistema in učinkovitejšemu odstranjevanju ROS, ki nastanejo kot posledica oksidativnega stresa. Delovanje encimov SOD in GPX, ki predstavljata prvo linijo obrambe pred ROS, je odvisno od koncentracije Se in vit. E v krvni plazmi, zato dodatek izboljša encimsko učinkovitost. Višje koncentracije Se in vit. E v krvni plazmi so povezane s statistično pomembno višjimi vrednostmi encimov SOD in GPX ter statistično pomembno višjimi vrednostmi TAS, ki predstavljajo skupno antioksidativno zaščito.
- Dodatek Se in kombinacije vit. AD$_3$E je smiseln za zmanjševanje metabolnega stresa, saj obstaja razlika v koncentraciji metabolitov NEFA in BHB glede na to, ali krave prejmejo dodatek ali ne. V krvni plazmi tretiranih živali je bila koncentracija NEFA in BHB statistično pomembno nižja. Tretiranje z antioksidanti je učinkovito za zmanjševanje negativne energijske bilance in posledično zmanjšanje metabolnega stresa.
- Oksidativni in metabolni stres imata negativni učinek na parametre plodnosti in zdravje molznic, saj obstaja razlika v parametrih plodnosti in v pojavu reprodukcijskih motenj glede na koncentracijo vit. E, Se, TAS, GPX, SOD, NEFA in BHB. Preventivno dajanje antioksidantov je smiselno za zmanjševanje oksidativnega in metabolnega stresa ter pripomore k izboljšanju parametrov plodnosti in reprodukcijskih značilnosti.
- Obstaja povezava med oksidativnim statusom oz. koncentracijo TAS, vit. E in Se v FF in krvni plazmi.
- Dodajanje antioksidantov Se in vit. AD$_3$E je učinkovit in smiseln preventivni ukrep za zmanjšanje posledic ter negativnih vplivov oksidativnega in metabolnega stresa na plodnost. Tako se izboljšali reprodukcijski parametri pri kravah po porodu in uspešnost implantacij vnesenih zarodkov pri telicah.

7 POVZETEK

Dodatna aplikacija Se in kombinacije vitaminov AD_3E pri kravah pred porodom in telicah prejemnicah pred vstavitvijo zarodkov se je izkazala kot smiselna. Raziskavo za potrebe doktorskega dela smo opravili na zasebni kmetiji s cca. 350 živalmi; primarna dejavnost je tržna prireja mleka. V raziskavo je bilo vključenih 34 krav v tretji laktaciji črno-bele pasme, od tega 16 v tretirani in 18 v netretirani oz. kontrolni skupini, ter 34 telic črno-bele pasme, na katerih smo opravljali prenos zarodkov (17 telic v kontrolni in 17 v tretirani skupini). Vse krave in telice vključene v raziskavo so bile izpostavljene enakim rejnim in klimatskim pogojem (rejene v načinu proste reje, nastanjene v odprtem hlevu); dobile so enak osnovni obrok na krmnem hodniku in poleg tega še močna krmila na računalniško vodenem krmnem avtomatu. Vsebnost Se v osnovnem obroku je bila 0,235 mg/kg suhe snovi, vsebnost vit. E pa 36,2 mg/kg suhe snovi. Na računalniško vodenem krmilniku so prejele še močna krmila, ob posameznem krmljenju 1,5 kilograma krmil z vsebnostjo 0,355 mg/kg Se ter 26,2 mg/kg vit. E. S tem so bile pokrite osnovne potrebe živali po Se in vit. E. Tretiranim živalim smo parenteralno aplicirali Se (TOKOSELEN, GENERA) in kombinacijo vitaminov AD_3E (Vitamin AD_3E, Krka) – 35 ml vit. AD_3E (700 mg vit. E) i/m in 20 ml Tokoselena (3000 mg vit. E, 10 mg Se), kravam trikrat (sedem dni pred predvidenim porodom, na dan poroda in 14 dni po porodu) ter dvakrat telicam (14 in 7 dni pred vnosom zarodka). Kri za določanje plazemske aktivnosti GPX, aktivnosti SOD, koncentracije TAS, BHB, NEFA ter Se in vit. E smo kravam odvzeli štirikrat (pred prvim tretiranjem, ob porodu, 14 po porodu ter 28 dni po porodu), telicam pa enkrat (pred vstavitvijo zarodka).

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da ima preventivno tretiranje pozitivne učinke na zmanjševanje metabolnega, oksidativnega in vročinskega stresa ter njegovih posledic na zdravje in reprodukcijske parametre. Prekomerna proizvodnja prostih radikalov v času telitve in v začetku intenzivne laktacije je oslabila delovanje celičnih antioksidantnih obrambnih sistemov (nastopil je oksidativni stres), kar kažejo pomembne spremembe indikatorjev oksidativnega stresa (SOD, GPX, vit. E, Se, TAS). Ker pa so razlike med skupinama, predvsem pri drugem in tretjem vzorčenju, ko si bile molznice telesno najbolj obremenjene, statistično pomembne, to dokazuje, da je dajanje antioksidantov (Se, vit. AD_3E) smiselno.

Koncentracije vit. E in Se v krvni plazmi so bile pri obeh skupinah pred prvim tretiranjem (en teden pred porodom) zadostne; razlik ni bilo. Padec vrednosti opazimo že ob porodu, izraziteje

dva tedna po porodu. Najnižje vrednosti Se in vit. E v obeh skupinah smo zabeležili 14 dni po porodu, kar se nekoliko razlikuje od navedb Oldhama in sod. (1991), kjer navajajo, da začnejo vrednosti vit. E in Se v krvi padati že 15 dni pred telitvijo in dosežejo najnižjo vrednost v času telitve. V tretirani skupini je celo opazen porast od prvega do drugega merjenja, kar lahko pripišemo vplivu dodajanja vit. E in Se. Rezultati kažejo, da je za vzdrževanje želene ravni vitaminov v času telitve ter zmanjšanje pričakovanega upada na začetku laktacije potreben dodatek vit. E in Se za krave ob porodu. Ker je koncentracija vit. E v kolostrumu zelo visoka, se koncentracija tega vitamina v obtoku med telitvijo posledično zmanjša. Pri kontrolni skupini z napredovanjem laktacije opazimo postopno upadanje antioksidativne aktivnosti oz. parametra TAS, verjetno zaradi izčrpavanja v maščobi topnih antioksidantov z mlekom; enako so že ugotovili Castillo in sod. (2005). Pri tretirani skupini upad ni bil tako izrazit, verjetno zaradi dodajanja Se in vit. E. Dodajanje antioksidantov je očitno povečalo učinkovitost odziva; podobno so ugotovili Brzezinska-Slebodzinska in sod. (1994). Ugotovili smo, da so koncentracije TAS v tretirani skupini dosegle najvišjo vrednost po telitvi. To kaže na to, da se lahko antioksidativni sistem s pomočjo mineralnih in vitaminskih dodatkov v tem kritičnem obdobju učinkovito spopada s proizvodnjo lipoperoksida in tako ščiti pred oksidativnim stresom, ki je vzrok več reprodukcijskih bolezni (Miller in sod., 1993; Castillo in sod., 2005). Povprečne aktivnosti SOD so se v celotnem spremljanem času postopoma povečevale, kot so se tudi v raziskavi Konvična in sod., 2015. Visoke vrednosti SOD in GPX v drugem oz. v četrtem tednu lahko razlagamo kot prizadevanje organizma, da se prilagodi visoki ravni proizvodnje ROS. Zaščitni sistem antioksidanta GPX je odvisen od koncentracije Se v telesu, ki je potrebna za vzdrževanje biokemijsko-fizioloških funkcij, kot so biološki antioksidant, imunska funkcija, reprodukcija in presnova ščitničnih hormonov (Surai in Fisinin, 2014), zato ne preseneča, da smo z dodajanjem Se izboljšali aktivnosti encima GPX v tretirani skupini.

Povprečna vsebnost NEFA in BHB v krvni plazmi je pokazala znatna nihanja v obdobju laktacije, pri čemer je najvišja vrednost obeh markerjev v obeh skupinah v 2. tednu po porodu, ko je organizem metabolno najbolj obremenjen (LeBlanc, 2010b), in najnižja vrednost v 4. tednu po porodu, vendar je razlika v stanju NEB med skupinama statistično pomembna. Pri molznicah, ki so prejele kombinacijo vit. E in Se, je bila koncentracija NEFA in BHB nižja, s čimer smo omilili negativne posledice na zdravstveno stanje in reprodukcijske sposobnosti živali (Lucy in sod., 1991; Leroy in sod. 2004). Naši rezultati se ujemajo z rezultati Vandehaarja in sod. (1999), ki so pokazali, da hranjenje z obrokom, ki vsebuje višjo vsebnost energije in

dodatke vit. E in Se vodi do zmanjšanja koncentracije NEFA v krvi in boljše energijske bilance.

Pri tretirani skupini molznic smo po porodu diagnosticirali pomembno manj primerov zaostale posteljice, endometritisa in ovarialnih cist. Z našo raziskavo smo potrdili navedbe Harrisona in sod. (1984), ki so v raziskavi ugotovili, da je injiciranje Se in peroralni dodatek vit. E pred porodom povezan z nižjo incidenco zaostale posteljice, metritisa in cist na jajčnikih. Določili smo tudi markerje oksidativnega stresa in antioksidantnega statusa (TAS, GPX, Se, vit. E) ter metabolni profil (BHB in NEFA) ter primerjali vrednosti med skupino krav s katero izmed reprodukcijskih motenj in zdravo kontrolno skupino. Rezultati kažejo povišane kazalnike oksidativnega stresa in zmanjšanje antioksidantov pri kravah s katerokoli reprodukcijsko motnjo. Enako poročajo Bionaz in sod. (2007), in sicer da lahko zmanjšana koncentracija vit. E, Se ter TAS poleg povečanih koncentracij NEFA in BHB, privede do zvišanja števila zaostale posteljice pri kravah in endometritisa. Tudi čas, potreben za involucijo maternice, je statistično pomembno različen med skupinama in je krajši v tretirani skupini, kjer je bila med 14. in 21. dnem po porodu involucija zaključena pri desetih kravah (62,5 %), v kontrolni pa samo pri sedmih (38,9 %). Pri vseh preostalih molznicah iz tretirane skupine (N=6) je bila involucija zaključena med 22. in 28. dnem po porodu, v kontrolni pa je bilo nekaj primerov, kjer je bil čas daljši (dva primera med 29. in 35. dnem po porodu). Razlika je tudi v uspešnosti prve osemenitve; uspešnost je bila pri tretiranih 56 % (kontrolna skupina 44 %) ter v dolžini servisnega intervala, ki je bil pri tretiranih krajši. V kontrolni skupini smo diagnosticirali več reprodukcijskih motenj, ki so zahtevale zdravljenje; tudi zato se je čas do prve osemenitve pomembno podaljšal. Kasneje, pri servisni periodi, poporodnem premoru in dobi med telitvama pomembnih razlik nismo več opazili.

Primerjava števila uspelih implantacij zarodkov med kontrolno in tretirano skupino kaže v prid slednje, saj je v tej skupini 64,7 % telic ostalo brejih po transferu zarodka ter donosilo zdrava teleta. V kontrolni skupini je bila implantacija uspešna v 41,2 %.

Glede na to, da so bile vse živali vključene v našo raziskavo, sicer izpostavljene enakim klimatskim in prehranskim pogojem, lahko dobljene razlike pripišemo učinkom preventivnega dodajanja Se in kombinacije vitaminov AD$_3$E. V raziskavi smo uspeli dokazati, da lahko s preventivnimi ukrepi, kot je dodajanje vitaminov in mineralov, blažimo učinke oksidativnega stresa in krepimo sposobnost organizma za boljše odstranjevanje ROS in izboljšujemo energijski status goveda. Z različnimi načini in metodami si prizadevamo, da bi zmanjševali in

preprečevali oslabljeno zdravstveno stanje, bolezni in reprodukcijske motnje v mlečnih čredah, ki so posledica oksidativnega, vročinskega in metabolnega stresa, saj ne predstavljajo samo dodatnih stroškov zaradi zdravljenja, ampak tudi gospodarske izgube zaradi manjše količine proizvedenega mleka. Dodajanje Se in vit. E se je izkazalo kot učinkovit preventivni ukrep.

8 SUMMARY

Supportive therapy with Se and a combination of AD$_3$E vitamins in prepartum cows and recipient heifers before embryo transfers has proved to be beneficial. The research for the doctoral thesis was carried out on a private farm with approx. 350 animals where the primary activity is milk production. The research included 34 cows in the third lactation of the Holstein Friesian breed, 16 in the treated, and 18 in the non-treated or control group. Additionally, 34 heifers of the Holstein Friesian breed were also included (17 heifers in the control group and 17 in the treated group) on which we carried out embryo transfers. All cows and heifers included in the research were exposed to the same climatic conditions (raised free-range and housed in an open barn) and received the same basic diet in the feed aisle, in addition to the concentrates on a computerized feed machine. The content of Se in the basic ration was 0.235 mg/kg of dry matter whereas the content of vit. E was 36.2 mg/kg of dry matter. They additionally received concentrated feed through a computer-controlled feeder, namely 1.5 kg each, with a Se content of 0.355 mg/kg and 26.2 mg/kg of vitamin E. This covered the animal basic Se and vit. E requirements. The treated animals were parenterally administered Se (TOKOSELEN, GENERA) and a combination of vitamins AD$_3$E (Vitamin AD$_3$E, Krka) – 35 ml of vit. AD$_3$E (700 mg vit. E) i/m and 20 ml Tocoselena (3000 mg vit. E, 10 mg Se). Cows received Se and AD$_3$E three times (seven days before expected parturition, on the day of parturition, and 14 days after parturition) and heifers twice (14 and seven days before ET). Blood for determination of plasma GPX activity, SOD activity, concentrations of TAS, BHB, NEFA, Se, and vit. E was taken from cows four times (before the first treatment, at parturition, 14 after parturition, and 28 days after parturition) and from heifers once (before ET).

According to the results, we can conclude that preventive treatment has a positive effect on reducing metabolic, oxidative, and heat stress and its consequences on health and reproductive parameters. Excessive production of free radicals during calving and at the beginning of intensive lactation weakened the functioning of cellular antioxidant defense systems (oxidative stress occurred) which is shown by significant changes in indicators of oxidative stress (SOD, GPX, vit. E, Se, TAS). Nevertheless, the differences between the groups, especially in the second and third sampling when dairy cows were physically under the greatest stress are statistically significant. This proves that the administration of antioxidants (Se, and vit. AD$_3$E) is beneficial.

Levels of vit. E and Se in blood plasma before the initial treatment (a week before parturition) were sufficient in both groups and there were no differences. A decrease in values is observed already upon delivery and becomes more pronounced two weeks after delivery. The lowest values of Se and vit. E in both groups were recorded 14 days after delivery, which differs slightly from the findings of Oldham et al. (1991) where they state that the values of vit. E and Se in the blood begin to drop almost 15 days before calving and reach their lowest value at the time of calving. In the treated group, there is even a noticeable increase from the first to the second measurement, which can be attributed to the effect of the vit. E and Se supplementation. The results show that to maintain a desired level of vitamins during calving and to reduce the decline at the beginning of lactation, supplementation of vit. E and Se is necessary for cows at calving. Since the concentration of vit. E is very high in colostrum, the concentration of this vitamin in the circulation during calving consequently decreases. A gradual decrease in the antioxidant activity or the TAS parameter is observed in the control group during lactation, which is most likely due to the depletion of fat-soluble antioxidants in milk, as Castillo et al. (2005) already established. In the treated group, the decrease is not so distinct, most likely due to the supplementation of Se and vit. E. Supplementation of antioxidants evidently increased the efficiency of the response, which was similarly found by Brzezinska-Slebodzinska et al. (1994). We found that TAS levels in the treated group reached the highest value after calving. This suggests that by adding mineral and vitamin supplements the antioxidant system can effectively combat the production of lipoperoxide during this critical period and thus protect against oxidative stress caused by several reproductive diseases (Miller et al., 1993; Castillo et al., 2005). Average SOD activities gradually increased throughout the monitored period, as was also the case in the research performed by Konvična et al., 2015. The high values of SOD and GPX in the second and the fourth weeks can be interpreted as an effort of the organism to adjust to the high levels of ROS production. The protective system of the GPX antioxidant is dependent on the level of Se in the body required to maintain biochemical and physiological functions, such as a biological antioxidant, immune function, reproduction, and metabolism of thyroid hormones (Surai and Fisinin, 2014). Therefore, it comes as no surprise that supplementation of Se improved the activity of the GPX enzyme in the treated group.

The average content of NEFA and BHB in blood plasma showed significant fluctuations during the lactation period, with the highest value of both markers in both groups in the second week after delivery when the organism is metabolically most stressed (LeBlanc, 2010b) and the

lowest value in the fourth week after delivery. However, the difference in NEB status between the groups is statistically significant. In dairy cows that received a combination of vit. E and Se, the level of NEFA and BHB is lower, which mitigated the negative consequences on the health and reproductive abilities of animals (Lucy et al., 1991; Leroy et al. 2004). Our results align with those of Vandehaar et al. (1999), which showed that feeding a prepartum diet containing a higher energy content and supplements of vit. E and Se leads to a decreased concentration of NEFA in blood and an improved energy balance.

In the treated group of dairy cows, significantly fewer cases of retained placenta, endometritis, and ovarian cysts were diagnosed after delivery. With our research, we confirmed the findings of Harrison et al. (1984) whose research found that injection of Se and oral supplementation of vit. E before delivery relates to a lower incidence of retained placenta, metritis, and ovarian cysts. We also determined markers of oxidative stress and antioxidant status (TAS, GPX, Se, and vit. E) and metabolic profile (BHB and NEFA) and compared values between a group of cows with one of the reproductive disorders and a healthy control group. The results show elevated indicators of oxidative stress and decreased antioxidants in cows with any reproductive disorder. The same was reported by Bionaz et al. (2007) who found that a lower level of vit. E, Se, and TAS, along with an increased level of NEFA and BHB, leads to an increase in the number of diagnoses of retained placenta in cows and endometritis. The required time for uterine involution was also statistically significantly different in both groups and was shorter in the treated group where involution was completed in ten cows (62.5 %) between the 14^{th} and the 21^{st} day following delivery, compared to the control group where involution was completed in only seven cows (38.9 %). In all remaining dairy cows from the treated group (N=6), involution was completed between the 22^{nd} and 28^{th} day after delivery while in the control group, there were a few cases where the time was longer (two cases between the 29^{th} and 35^{th} day after delivery). There was also a difference in the success rate of the initial insemination where the success rate was as high as 67.75 % in the treated group (50 % in the control group) and in the length of the service interval which was shorter within the treated group. In the control group, we diagnosed several reproductive disorders that required treatment, which is also why the time until the initial insemination was significantly extended. Later, in the service period, the postpartum break and the period between calving, no significant differences were observed.

The comparison of the number of successful embryo implantations between the control and treatment groups appears to be in favor of the latter because in this group 64.7% of heifers

remained pregnant after the embryo transfer and delivered healthy calves. In the control group, the implantation success rate was 41.2%.

Since all of the animals included in our research were otherwise exposed to the same climatic and nutritional conditions, the resulting differences can be attributed to the effects of the preventive supplementation of Se and a combination of AD$_3$E vitamins. In our study, we were able to demonstrate that preventive measures, such as supplementation of vitamins and microelements, can hinder the effects of oxidative stress and strengthen the ability of the organism to remove ROS and improve the energy status of cattle better. Using various means and methods, we strive to reduce and prevent weakened health, disease, and reproductive disorders in dairy herds which come as a consequence of oxidative, heat, and metabolic stress because they do not just represent an additional expense due to required treatment but also result in economic loss due to a decrease in the amount of milk production. Supplementation of Se and vit. E has indeed proved to be an efficient prevention measure.

9 ZAHVALE

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Janku Mrkunu, ki me je strokovno vodil, usmerjal ter mi predajal znanje. V čast mi je bilo sodelovati.

Zahvaljujem se članom komisije doc. dr. Jožici Ježek, prof. dr. Marjanu Kosec, prof. dr. Janezu Salobir, izr. prof. dr. Milanu Maletić ter prof. dr. Martini Klinkon Ogrinec, ki so s svojimi predlogi pomembno vplivali na doktorsko delo.

Hvala strok. svet. mag. Mariji Nemec iz Klinike za reprodukcijo in velike živali ter asist. dr. Katarini Pavšič Vrtač iz Inštituta za varno hrano, krmo in okolje, ki sta mi nesebično pomagali pri laboratorijskem delu.

Hvala dr. Mateji Stvarnik iz Veterinarske fakultete za pomoč in nasvete pri pisanju doktorskega dela.

Hvala Biljani Grubišič za pomoč pri administrativnih zadevah in prijaznost.

Zahvaljujem se tudi vsem ostalim sodelavkam in sodelavcem, ki so mi v času doktorskega dela stali ob strani.

Zahvaljujem se domači kmetiji Šmigoc, na kateri je bila izvedena raziskava.

Na koncu se iz srca zahvaljujem svoji družini, še posebej moji partnerici Mateji, ki me je ljubeče spodbujala in bodrila na tej poti.

10 LITERATURA

1. Abd Ellah MR, Hussein HA, Derar DR. Ovarian follicular fluid constituents in relation to stage of estrus cycle and size of the follicle in buffalo. Vet World 2010; 3(6): 263−67.
2. Abd Hamid NA, Hasrul MA, Ruzanna RJ, et al. Effect of vitamin E (Tri E®) on antioxidant enzymes and DNA damage in rats following eight weeks exercise. Nutr J 2011, 23: e37 (7 str.) doi: 10.1186/1475-2891-10-37
3. Adewuyi AA, Gruys E, van Eerdenburg FJ. Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle: a review. Vet Q 2005; 27(3): 117−26.
4. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. Reprod Biol Endocrinol 2005; 3: e28(21 str.) doi: 10.1186/1477-7827-3-28
5. Allison RD, Laven RA. Effect of vitamin E supplementation on the health and fertility of dairy cows: a review. Vet Rec 2000; 147(25): 703−8.
6. Ambrožič I. Znamenje pojatev, njihovo odkrivanje in optimalni čas osemenitve in metode ugotavljanja brejosti. In: Kosec M. ed. Osemenjevanje govedi: Priročnik za rejce. Ljubljana: Veterinarski zavod Slovenije 2000: 61–72.
7. Aréchiga CF, Ortíz O, Hansen PJ. Effect of prepartum injection of vitamin E and selenium on postpartum reproductive function of dairy cattle. Theriogenology 1994; 41(6): 1251–8.
8. Arias LAQ, Fernández MV, González JJ, López MB, Herradon PJG, Martínez AIP. Subclinical endometritis in dairy cattle. In: Payan-Carreira, R. ed. New Insights into theriogenology. (online) London: IntechOpen, 2018. doi: 10.5772/intechopen.80229.
9. Armstrong DG, Gong JG, Webb R. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological, cellular and molecular mechanisms. Reprod Suppl 2003; 61: 403−14.
10. Arthur GH, Noakes DE, Pearson H, Parkinson TJ. In: Veterinary reproduction and obstetrics, 7th ed. London: WB Saunders Company, 1996.
11. Babnik, D. Pomen oskrbe krav z vitamini in minerali za dobro plodnost. Ljubljana: Kmetijski inštitut, 2013. https://www.govedo.si/files/cpzgss/knjiznica/seminarji/Minerali_in_vitamini_za_plodnost. pdf (16. 6. 2022)
12. Badinga L, Thatcher WW, Diaz T, Drost M, Wolfenson D. Effect of environmental heat stress on follicular development and steriodogenesis in lactating Holstein cows. Theriogenology 1993; 39: 797−810.

13. Beam SW. Follicular development in postpartum cattle: effects of energy balance and dietary lipid. New York: Cornell University, 1995. Doktorska disertacija.

14. Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. J Dairy Sci 2005; 88(6): 2017−26.

15. Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A. Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. J Dairy Sci 2002; 85(9): 2173−79.

16. Betteridge DJ. What is oxidative stress? Metabolism 2000; 49(2 Suppl 1): 3−8.

17. Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. Mol Reprod Dev 2000; 55(3): 282–8.

18. Bionaz M, Trevisi E, Calamari L, Librandi F, Ferrari A, Bertoni G. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. J Dairy Sci 2007; 90(4): 1740−50.

19. Bors SI, Bors A. Ovarian cysts, an anovulatory condition in dairy cattle. J Vet Med Sci 2020; 82(10): 1515−22.

20. Bouwstra RJ, Nielen M, Newbold JR, Jansen EH, Jelinek HF, van Werven T. Vitamin E supplementation during the dry period in dairy cattle. Part II: oxidative stress following vitamin E supplementation may increase clinical mastitis incidence postpartum. J Dairy Sci 2010; 93(12): 5696−706.

21. Briganti S, Picardo M. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. J Eur Acad Dermatol Venerol 2003; 17(6): 663−9.

22. Brzezinska-Slebodzinska E, Miller JK, Quigley III JD, Moore JR, Madsen FC. Antioxidant status of dairy cows supplemented prepartum with vitamin E and selenium. J Dairy Sci 1994; 77(10): 3087−95.

23. Buh A. Analiza plodnosti krav v čredi z visoko mlečnostjo. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2010. Diplomsko delo.

24. Butler WR, Smith RD. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. J Dairy Sci 1989; 72(3): 767−83.

25. Butler WR. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. Anim Reprod Sci 2000; 60/61: 449–57.

26. Calamari L, Maianti MG, Amendola F, Lombardi G. On some aspects of the oxidative status and on antioxidants in blood of dairy cows during summer. In: Proceeding of the 13th ASPA congress.

Piacenza: Franco Angeli, 1999: 449–51.

27. Campbell MH, Miller JK. Effect of supplemental dietary vitamin E and zinc on reproductive performance of dairy cows and heifers fed excess iron. J Dairy Sci 1998; 81(10): 2693–9.

28. Castillo C, Hernandez J, Bravo A, Lopez-Alonso M, Pereira V, Benedito JL. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. Vet J 2005; 169(2): 286–92.

29. Chapple IL. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory disease. J Clin Periodontol 1997; 24(5): 287–96.

30. Chauhan SS, Celi P, Ponnampalam EN, Leury BJ, Liu F, Dunshea FR. Antioxidant dynamics in the live animal and implications for ruminant health and product (meat/milk) quality: Role of vitamin E and selenium. Anim Prod Sci 2014; 54(10):1525–36.

31. Cigliano L, Strazzullo M, Rossetti C, et al. Characterization of blood redox status of early and mid-late lactating dairy cows. Czech J Anim Sci 2014; 59(4): 170–81.

32. Colazo MG, Ambrose DJ, Kastelic JP. Practical uses for transrectal ultrasonography in reproductive management of cattle. In: Proceedings of the 26th World Buiatrics Congress. Santiago: Chilean Buiatrics Society, 2010: 146–56.

33. Cook DL, Smith CA, Parfet JR, Youngquist RS, Brown EM, Garverick HA. Fate and turnover rate of ovarian follicular cysts in dairy cattle. J Reprod Fertil 1990; 90(1): 37–46.

34. Čengic B, Varatanovic N, Mutevelic T, Katica A, Mlaco N., Ćutuk A. Normal and abnormal uterine involution in cows monitored by ultrasound. Biotechnol Anim Husb 2012; 28(2): 205–17.

35. Dargatz DA, Ross PF. Blood selenium concentrations in cows and heifers on 253 cow-calf operations in 18 states. J Anim Sci 1996; 74: 2891–5.

36. Davies CJ, Hill JR, Edwards JL, et al. Major histocompatibility antigen expression on the bovine placenta: its relationship to abnormal pregnancies and retained placenta. Anim Reprod Sci 2004; 82–831: 267–80.

37. Day N. The diagnosis, differentiation, and pathogenesis of cystic ovarian disease. Vet Med 1991; 86(7): 753–76.

38. De Rensis F, Scaramuzzi RJ. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow: a review. Theriogenology 2003; 60(6): 1139−51.

39. Dirandeh E, Towhidi A, Zeinoaldini S, Ganjkhanlou M, Ansari Pirsaraei Z, Fouladi-Nashta A. Effects of different polyunsaturated fatty acid supplementations during the postpartum periods of early lactating dairy cows on milk yield, metabolic responses, and reproductive performances. J Anim Sci 2013; 91(2): 713–21.

40. Droge W. Free radicals in the control of cell function. Physiol Rev 2002; 82(1): 47–95.

41. Dubuc J, Duffield T, Leslie K, Walton J, Leblanc S. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. J Dairy Sci 2010; 93(12):5764–71.

42. Duffield TF, LeBlanc S, Bagg R, Leslie K, Ten Hag J, Dick P. Effect of a monensin controlled release capsule on metabolic parameters in transition dairy cows. J Dairy Sci 2003; 86(4): 1171–6

43. Duffield TF, Leslie KE, Sandals D, et al. Effect of a monensin-controlled release capsule on cow health and reproductive performance. J Dairy Sci 1999; 82(11): 2377–84.

44. Dzobo K, Naik Y. Effect of selenium on cadmium-induced oxidative stress and esterase activity in rat organs. S Afr J Sci 2012; 109(5/6): 1–8.

45. Ealy AD, Drost M, Hansen PJ. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. J Dairy Sci 1993; 76(10): 2899−905.

46. Eger S, Drori D, Kadoori I, Miller N, Schindler H. Effects of selenium and vitamin E on incidence of retained placenta. J Dairy Sci 1985;68(8): 2119–22.

47. El-Boshy ME, Risha EF, Abdelhamid FM, Mubarak MS, Hadda TB. Protective effects of selenium against cadmium induced hematological disturbances, immunosuppressive, oxidative stress and hepatorenal damage in rats. J Trace Elem Med Biol 2015; 29: 104–10.

48. Ellis RH, Herdt TH, Stowe HD. Physical, hematologic, biochemical, and immunologic effects of supranutritional supplementation with dietary selenium in Holstein cows. Am J Vet Res 1997; 58(7): 760–4.

49. Evans WJ. Vitamin E, vitamin C, and exercise. Am J Clin Nutr 2000; 72(2 Suppl): 647–52.

50. Ewing WN, Charlton SJ. The minerals directory. 2nd ed. Leicestershire: Context Products, 2007.

51. Fenwick MA, Llewellyn S, Fitzpatrick R, et al. Negative energy balance in dairy cows is associated with specific changes in IGF-binding protein expression in the oviduct. Reproduction 2008; 135(1): 63–75.

52. Ferčej J, Skušek F. Govedoreja. Ljubljana: Državna založba Slovenije, 1988.

53. Festila I, Miresan V, Raducu C, Cocan D, Constantinescu R. Evaluation of oxidative stress in dairy cows through antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GPX) and superoxide dismutase (SOD). Bull Uni Agric Sci Vet Med Anim Sci Biotechnol 2012; 69(1-2): 107–10.

54. Foltys V, Kirchnerova K, Hetenyi L. Improvement of health status in dairy cows and decrease of somatic cell counts in milk by feeding the organic selenium. Zb Bioteh Fak Univ Ljub. Kmet

2001; 31(Suppl): 157–62.

55. Gautam G, Nakao T, Yusuf M, Koike K. Prevalence of endometritis during the postpartum period and its impact on subsequent reproductive performance in two Japanese dairy herds. Anim Reprod Sci 2009; 116(3-4):175–87.

56. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. Free Radic Biol Med 2000; 29 (11): 1106–14.

57. Giray B, Kan E, Bali M, Hincal F, Basaran N. The effect of vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in hemodialysis patients. Clin Chim Acta. 2003; 338(1-2): 91–8.

58. Goff JP, Stabel JR. Decreased plasma retinol, α-tocopherol and Zn concentration during the periparturient period: effect of milk fever. J Dairy Sci 1990; 73(11): 3195–99.

59. Goff JP. Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. Journal of Dairy Sci 2006; 89(4): 1292-301.

60. Goff JP. Managing the transition cow-consideration for optimising energy balance and immune function. Cattle Pract 2003; 11(2): 51–63.

61. Gosden GR, Hunter HF, Telfer E, Torrance C, Brown N. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. J Reprod Fertil 1988; 82(2): 813−25.

62. Grant RJ, Albright JL. Feeding behavior and management factors during the transition period in dairy cattle. J Anim Sci 1995; 73(9): 2791–803.

63. Grummer RR, Mashek DG, Hayirli A. Dry matter intake and energy balance in the transition period. Vet Clin North Am Food Anim Pract 2004; 20(3): 447–70.

64. Gutteridge JMC. Biological origin of free radicals, and mechanism of antioxidant protection. Chem Biol Interact 1994; 91(2/3): 133–40.

65. Hall JA, Bobe G, Hunter JK, et al. Effect of feeding selenium-fertilized alfalfa hay on performance of weaned beef calves. PLoS One 2013; 8(3): e58188 (8 str.) doi: 10.1371/journal.pone.0058188

66. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence. Lancet 1994; 344(8924): 721–4.

67. Harmon RJ, Lu M, Trammel DS, Smith BA. Influence of heat stress and calving on antioxidant activity in bovine blood. J Dairy Sci 1997; 80(1): 264–76.

68. Harris PA, Coenen M, Frape D, Jeffcott LB, Meyer H. Equine nutrition and metabolic diseases. In: Higgins AJ, Snyder JR, eds. The equine manual. 2nd ed. Edinburgh: Elsevier Saunders: 2006:

151–222.

69. Harrison JH, Conrad HR. Selenium content and glutathione peroxidase activity in tissues of the dairy cow after short-term feeding. J Dairy Sci 1984; 67(10): 2464–70

70. Harrison JH, Hancock DD, Conrad HR. Vitamin E and selenium for reproduction of the dairy cow. J Dairy Sci 1984; 67(1): 123–32.

71. Harrison RO, Ford SP, Young JW, Conley AJ, Freeman AE. Increased milk production versus reproductive and energy status of high producing dairy cows. J Dairy Sci 1990; 73(10): 2749–58.

72. Ho YS, Magnenat JL, Bronson RT, et al. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. J Biol Chem 1997; 272(26): 16644–51.

73. Ho YS, Xiong Y, Ma W, Spector A, Ho DS. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. J Biol Chem 2004; 279(31): 32804–12.

74. Horváth M., Babinszky L. Impact of selected antioxidant vitamins (vitamin A, E and C) and micro minerals (Zn, Se) on the antioxidant status and performance under high environmental temperature in poultry: a review. Acta Agric Scand A Anim Sci 2018; 68(3): 152-60.

75. Hussein AM, Aziz RLA, Abdel-Wahab A, El-Said H. Preliminary study of factors affecting the superovulatory response of high producing dairy cows superstimulated regardless of the stage of estrous cycle in Egypt. Beni Suef Univ J Basic and Appl Sci 2014; 3(4): 286-92.

76. Hussein AM, Daniel RCW. Bovine normal and abnormal reproductive and endocrine functions during the post partum period: a review. Reprod Domest Anim 1991; 26(3): 101–11.

77. Jain VK, Bansal RK, Aggarwal SK, Chandhary SD, Saini AS. Erythrocyte glutathione peroxidase activity and plasma vitamin E status in patients with psoriasis. J Dermatol 1988; 15(6): 487–90.

78. Jenko J. Heat stress risk alert system for dairy cattle in Slovenia. Acta Agric Slov 2012; Suppl 3: 291–4.

79. Ježek J, Cincović MR, Nemec M, et al. Beta-hydroxybutyrate in milk as screening test for subclinical ketosis in dairy cows. Pol J Vet Sci 2017; 20(3): 507–12.

80. Jihen el H, Imed M, Fatima H, Abdelhamid K. Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver and kidney of the rat: histology and Cd accumulation. Food Chem Toxicol 2008; 46(11): 3522–7.

81. Juniper D, Phipps R, Jones AK, Bertin G. Selenium supplementation of lactating dairy cows: effect on selenium concentration in blood, milk, urine, and feces. J Dairy Sci 2006; 89(35): 44–51.

82. Kaidi R, Brown PJ, David JSE. Uterine involution in cattle. Vet Annu 1991; 31: 38–50.

83. Kalmath GP, Ravindra JP. Mineral profiles of ovarian antral follicular fluid in buffaloes during follicular development. Indian J Anim Res 2007; 41(2): 87−93.

84. Kamimura S, Ohgi T, Takahashi M, Tsukamoto T. Postpartum resumption of ovarian activity and uterine involution monitored by ultrasonography in Holstein cows. J Vet Med Sci 1993; 55(6): 643–7.

85. Kankofer M. Antioxidative defence mechanisms in bovine placenta and their importance for placental release. Reprod Domest Anim 2000; 35(5): 229–33.

86. Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, et al. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. Theriogenology 2004; 62(1/2): 9–23.

87. Kendall NR, Bone P. Fertility and trace elements-an understand problem. Cattle Pract 2006; 14(1): 17–22.

88. Khan HM, Mohanty T, Bhakat M, Gupta AK, Tyagi AK, Mondal G.. Effect of vitamin E and mineral supplementation on biochemical profile and reproductive performance of buffaloes. Buffalo Bull 2015; 34(1): 63-78.

89. Kimura K, Goff JP, Kehrli ME Jr., Reinhardt TA. Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. J. Dairy Sci 2002; 85(3): 544–50.

90. King GJ, Hurnik JF, Robertson HA. Ovarian function and estrus in dairy cows during early lactation. J Anim Sci 1976; 42(3): 688–92.

91. Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutase in malignant cells and human tumors. Free Radic Biol Med 2004; 36(6): 718–44.

92. Kizil O, Akar Y, Yuksel M, Saat N. Oxidative stress in cows with acute puerperal metritis. Revue Med Vet 2010;161(7): 353–7.

93. Kohen R. Skin antioksidants: their role in aging and in oxidative stress-new approaches for their evaluation. Biomed Pharmacother 1999; 53(4): 181–92.

94. Kökçam I, Naziroğlu M. Antioxidants and lipid peroxidation status in the blood of patients with psoriasis. Clinical Trial 1999; 289: 23–31.

95. Konvična J, Vargová M, Paulíková I, Kovač G, Kostecká Z. Oxidative stress and antioxidant status in dairy cows during prepartal and postpartal periods. Acta Vet Brno 2015; 84: 133–40.

96. Kumagai H, Chaipan Y. Changes of vitamin E status of periparturient dairy cows and newborn

calves. Anim Sci J 2004; 75(6): 541–47.

97. Lamming GE, Bulman DC. The use of milk progesterone radioimmunoassay in the diagnosis and treatment of subfertility in dairy cows. Br Vet J 1976; 132: 507–17.

98. Lapointe J, Bilodeau JF. antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. Biol Reprod 2003; 68(4): 1157–64.

99. LeBlanc S. Health in the transition period and reproductive performance. Adv Dairy Technol 2010a; 22: 97–110.

100. LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, Johnson WH.. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. J Dairy Sci 2002; 85(9): 2223–36.

101. LeBlanc SJ, Herdt TH, Seymour WM, Duffield TF, Leslie KE. Peripartum serum vitamin E, retinol, and beta-carotene in dairy cattle and their associations with disease. J Dairy Sci 2004; 87(3): 609–19.

102. LeBlanc SJ. Monitoring metabolic health of dairy cattle in transition period. J Reprod Dev 2010b; 56(Suppl1): 529–35.

103. Leroy JL, Vanholder T, Delanghe JR, et al. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. Anim Reprod Sci 2004; 80(3/4): 201–11.

104. Leslie KE. The events of normal and abnormal postpartum reproductive endocrinology and uterine involution in dairy cows: a review. Can Vet J. 1983; 24(3): 67–71.

105. Lewis GS. Uterine health and disorders. J Dairy Sci 1997; 80(5): 984–94.

106. Longnecker MP, Stram DO, Taylor PR, et al. Use of selenium concentration in whole blood, serum, toenails, or urine as a surrogate measure of selenium intake. Epidemiology 1996; 7(4): 384–90.

107. Lopez H, Satter LD, Wiltbank MC. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. Anim Reprod Sci 2004; 81(3/4): 209–23.

108. Lopez-Diaz MC, Bosu WTK. A review and an update of cystic ovarian degeneration in ruminants. Theriogenology 1992; 37(6): 1163–83.

109. López-Gatius F, Santolaria P, Yániz J, Fenech M, López-Béjar M. Risk factors for postpartum ovarian cysts and their spontaneous recovery or persistence in lactating dairy cows. Theriogenology 2002; 58(8): 1623–32.

110. López-Gatius F. Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain. Theriogenology 2003; 60(1): 89–99.

111. Lucy MC, Staples CR, Michel FM, Thatcher WW. Energy balance and size and number of ovarian follicles detected by ultrasonography in early postpartum dairy cows. J Dairry Sci 1991; 74(2): 473–82.

112. MacPherson A, Kelly EF, Chalmers JS, Roberts DJ. The effect of selenium deficiency on fertility in heifers. In: Proceedings of the 21st Annual Conference on Trace Substances in Environmental Health. Missouri: University of Missouri, 1984; 551–5.

113. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. Clin Biochem 1999; 32 (8): 595–603.

114. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. Toxicology 2000; 153(1/3): 83–104.

115. Mattos R, Staples CR, Tatcher WW. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. Rev Reprod 2000; 5(1): 38–45.

116. McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD, Morgan CA, Sinclair LA, Wilkinson RG. Animal nutrition. 7 th ed. Toronto: Pearson Canada, 2010: 70–102. https://gohardanehco.com/wp-content/uploads/2014/02/Animal-Nutrition.pdf (6. apr. 2022)

117. McLeod BJ, Williams ME. Incidence of ovarian dysfunction in post partum dairy cows and the effectiveness of its clinical diagnosis and treatment. Vet Rec 1991; 128(6):121–4.

118. Miller JK, Brzezinska-Slebodzinska E, Madsen FC. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. J Dairy Sci 1993; 76(9): 2812–23.

119. Moradas-Ferreira P, Costa V, Piper P, Mager W. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. Mol Microbiol 1996; 19(4): 651−8.

120. Mordak R, Stewart PA. Periparturient stress and immune suppression as a potential cause of retained placenta in highly productive dairy cows: examples of prevention. Acta Vet Scand 2015; 57: e84 (8 str.) doi: 10.1186/s13028-015-0175-2

121. Mrkun J. Funkcionalna anatomija spolnih organov in osnovna fiziologija spolnega ciklusa pri kravah. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2012.

122. Nigussie T. A Review on the Role of Energy Balance on Reproduction of Dairy Cow. J Dairy Res Tech 2018; 1(1(: e3 (9str.) doi: 10.24966/DRT-9315/100003

123. Oldham ER, Eberhart RJ, Muller LD. Effects of supplemental vitamin A or beta-carotene during the dry period and early lactation on udder health. J Dairy Sci 1991;74(11): 3775– 81.

124. Opsomer G . Anoestrus postpartum in high yielding dairy cows: a field study Gent: Faculteit Diergeneeskunde, 1999. Doktorska disertacija.

125. Opsomer G, Coryn M, de Kruif A. Postpartum anoestrus in high yielding dairy cows, Post partum anoestrus bij hoog productief melk vee. Vlaams Diergeneesk Tijdschr 2004; 73: 112–8.

126. Opsomer G, Coryn M, Deluyker H, de Kruif A. An analysis of ovarian dsyfunction in high yielding dairy cow after caving based od progesterone profilec. Reprod Dom Anim 1998; 33(3/4): 193–204.

127. Opsomer G, Gröhn YT, Hertl J, Coryn M, Deluyker H, de Kruif A. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. Theriogenology 2000; 53(4): 841–57.

128. Orešnik A, Kermauner A. Osnove prehrane. Slovenj Gradec: Kmetijska založba, 2009.

129. Orešnik A. Vodenje reprodukcijskih dogajanj in plodnost krav molznic. Sodobno kmetijstvo, 1995; 28(4): 182–90.

130. Orešnik A. Vzroki plodnostnih motenj pri kravah molznicah. Zb Bioteh Fak Univ Lj, Kmet. 1999; 74(1): 65–75.

131. Osredkar J. Oksidativni stres. Zdrav Vest 2012; 81(5): 393–406.

132. Panda N, Kaur H. Effect of vitamin E supplementation on antioxidant status of murrah buffaloes. Indian J Anim Nutr 2005; 22(3): 185–90.

133. Passi S, Morrone A, De Luca C, Picardo M, Ippolito F. Blood levels of vitamin E, polyunsaturated fatty acids of phospholipids, lipoperoxides and glutathione peroxidase in patients affected with seborrheic dermatitis. J Dermatol Sci 1991; 2(3): 171–8.

134. Patrick JD, Sally DP, Ulrike L. Roles of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Ovarian Toxicity. Biol Reprod 2012; 86(2): 1–10.

135. Paula-Lopes FF, Lima RS, Risolia PHB, Ispada J, Assumpção MEOA, Visintin JA. Heat stress induced alteration in bovine oocytes: functional and cellular aspects Anim Reprod 2012; 9(2): 395−403.

136. Pinotti L, Manoni M, Fumagalli F, Rovere N, Tretola M. The role of micronutrients in high-yielding dairy ruminants: choline and vitamin E. Ankara Univ Vet Fak Derg 2020; 67: 209–14.

137. Pipan V. Pomen aktivnega spremljanja reprodukcijskih parametrov. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 1991. Magistrsko delo.

138. Podpečan O. Proučevanje in primerjava poporodnega obdobja pri prvesnicah in kravah v tretji

laktaciji. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2005. Magistrsko delo.

139. Politis I. Reevaluation of vitamin E supplementation of dairy cows: bioavailability, animal health and milk quality. Animal 2012; 6(9): 1427–34.

140. Pontes G, Monteiro P, Prata A, et al. Effect of injectable vitamin E on incidence of retained fetal membranes and reproductive performance of dairy cows. J Dairy Sci 2014; 98(4): 2437–49.

141. Pretsch W. Glutathione reductase activity deficiency in homozygous Gr1a1Neu mice does not cause haemolytic anaemia. Genet Res 1999; 73(1): 1–5.

142. Psotová J, Zahalkova J, Hrbač J, Šimanek V, Bartek J. Determination of total antioxidant capacity in plasma by cyclic voltammetry: two case reports. Biomed Papers 2001; 145(2): 81-3.

143. Radostits OM, Leslie KE, Fetrow J. Herd health food: animal production medicine 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 1994: 1141–58.

144. Rajamahendran R, Taylor C. Characterization of ovarian activity in postpartum dairy cows using ultrasound imaging and progesterone profiles. Anim Reprod Sci, 1990; 22(3): 171–80.

145. Ratiznojnik M. Kako omiliti vročinski stres [online]. Domžale: Govedorejsko poslovno združenje, 2018. https://gpz.si/kako-omiliti-vrocinski-stres/ (15. apr. 2022).

146. Ratiznojnik M. Škodljivi vpliv vročinskega stresa na reprodukcijo [online]. Domžale: Govedorejsko poslovno združenje, 2012. https://glasdezele.si/uncategorized/skodljivi- vpliv-vrocinskega-stresa-na-reprodukcijo/ (15. apr 2022).

147. Saeed M, Abbas G, Alagawany M, et al. Heat stress management in poultry farms: a comprehensive overview. J Therm Biol 2019; 84: 414–25.

148. Sajal G, Audrey C, Hope YY, Suzanne MC, Emily AH. Fluctuations in total antioxidant capacity, catalase activity, and hydrogen peroxide levels of follicular fluid during bovine folliculogenesis Reprod Fertil Dev 2011; 23(5): 673–80.

149. Santos JE, Bilby TR, Thatcher WW, Staples CR, Silvestre FT. Long chain fatty acids of diet as factors influencing reproduction in cattle. Reprod Domest Anim. 2008 ;43(Suppl 2): 23–30.

150. Santos JE, Bisinotto RS, Ribeiro ES, Lima FS, Greco LF, Staples CR, Thatcher WW. Applying nutrition and physiology to improve reproduction in dairy cattle. Soc Reprod Fertil Suppl 2010; 67: 387–403.

151. Sartori R, Souza AH, Guenther JN, et al. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. Anim Reprod 2004; 1(1): 86–90.

152. Savio JD, Boland MP, Hynes N, Roche JF. Resumption of follicular activity in the early post-partum period of dairy cows. J Reprod Fertil 1990; 88(2): 569–79.

153. Schallenberger E. Charakterisierung von Sekretionsrythmen der Gonadotropine und Ovarsteroide wahrend des Brunstzyklus, der Gravidität und post partum beim Rind. Berlin: P. Pariy, 1990.

154. Schauff DJ, Clark JH. Effects of feeding diets containing calcium salts of long-chain fatty acids to lactating dairy cows. J Dairy Sci 1992; 75(11): 2990–3002.

155. Schillo KK. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. J Anim Sci 1992; 70(4): 1271–82.

156. Seguí J, Gironella M, Sans M, et al. Superoxide dismutase ameliorates TNBS-induced colitis by reducing oxidative stress, adhesion molecule expression, and leukocyte recruitment into the inflamed intestine. J Leukoc Biol 2004; 76(3): 537–44.

157. Sharma N, Maiti SK. Effect of dietary supplementation of vitamin E and selenium in subclinical mastitis in dairy cows. Indian J Vet Med 2005; 25: 76–9.

158. Sharma N, Singh NK, Singh OP, Pandey V, Verma PK. Oxidative Stress and Antioxidant Status during Transition Period in Dairy Cows. Asian-Australas J Anim Sci 2011; 24(4): 479-84.

159. Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schuberth HJ. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. Biol Reprod 2009; 81(6): 1025–32.

160. Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. Defining postpartum uterine disease in cattle. Theriogenology 2006; 65(8): 1516–30.

161. Silvia WJ, Hatler TB, Nugent AM, Laranja da Fonseca LF. Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis. Domest Anim Endocrinol 2002; 23(1-2): 167–77.

162. Simensen E, Østerås O, Bøe KE, Kielland C, Ruud LE, Naess G. Housing system and herd size interactions in Norwegian dairy herds; associations with performance and disease incidence. Acta Vet Scand 2010; 52: e 14 (9 str.) doi: 10.1186/1751-0147-52-14

163. Singh N, Chander Narula S, Kumar Sharma R, Tewari S, Kumar Sehgal P. Vitamin E supplementation, superoxide dismutase status, and outcome of scaling and root planing in patients with chronic periodontitis: a randomized clinical trial. J Periodontol 2014; 85(2): 242–9.

164. Smith KL, Harrison JH, Hancock DD, Todhunter DA, Conrad HR. Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. J Dairy Sci 1984; 67(6): 1293–300.

165. Sordillo LM, Aitken SL. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy

cattle. Vet Immunol Immunopathol 2009; 128(1/3): 104–9.

166. Sordillo LM. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. Livestock Prod Sci 2005; 98(1/2): 89–99.

167. Staples CR, Thatcher WW, Clark JH. Relationship between ovarian activity and energy status during the early postpartum period of high producing dairy cows. J Dairy Sci 1990; 73(4): 938–47.

168. Steenvoorden DPT, Beijersbergen van Henegouven GMJ. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. J Photochem Photobiol 1997; 41(1/2): 1–10.

169. Stohs SJ. The role of free radicals in toxicity and disease. J Basic Clin Physiol Pharmacol 1995; 6(3/4): 205–28.

170. Stỳblo M, Walton FS, Harmon AW, Sheridan PA, Beck MA. Activation of superoxide dismutase in selenium-deficient mice infected with influenza virus. J Trace Elem Med Biol 2007; 21(1): 52–62.

171. Surai PF, Fisinin VI. Selenium in poultry breeder nutrition: an update. Animal Feed, Science and Technology 2014; 191: 1–15.

172. Suttle Nf. Mineral nutrition of livestock. 4th ed. Wallingford: CABI, 2010.

173. Šketa J. Anatomija in fiziologija spolnih organov krav. In: Osemenjevanje govedi: priročnik za rejce. Ljubljana: Veterinarski zavod Slovenije, 2000; 57–60.

174. Tabatabaei S, Mamoei M. Biochemical composition of blood plasma and follicular fluid in relation to follicular size in buffalo. Comp Clin Pathol 2011; 20: 441−5.

175. Tomašković A, Makek Z, Dobranić S, Samardžija M. Rasplođavanje krava i junica, Zagreb: Veterinarski fakultet, 2009.

176. Trasch K, Wehrend A, Bostedt H. Follow-up examinations of bitches after conservative treatment of pyometra with the antigestagen aglepristone. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 2003;50(7):375-379. doi:10.1046/j.1439-0442.2003.00557.x

177. Treiber N, Maity P, Singh K, Ferchiu F, Wlaschek M, Scharffetter-Kochanek K. The role of manganese superoxide dismutase in skin aging. Dermatoendocrinol 2012; 4(3): 232–5.

178. Trout JP, McDowell LR, Hansen PJ. Characteristics of the estrous cycle and antioxidant status of lactating Holstein cows exposed to heat stress. J Dairy Sci 1998; 81(5): 1244–50.

179. Underwood EJ, Suttle NF. The Mineral Nutrition of Livestock, 3rd ed. Wallingford CAB International, 1997.

180. Vaisberg CN, Jelezarsky LV, Dishlianova B, Chaushev TA. Activity, substrate detection and immunolocalization of glutathione peroxidase (GPX) in bovine reproductive organs and semen. Theriogenology 2005; 64(2): 416–28.

181. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telseer J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 2007; 39(1): 44–84.

182. van Knegsel ATM, van den Brand H, Dijkstra J. Effect of glucogenic vs. lipogenic diets on energy balance, blood metabolites, and reproduction in primiparous and multiparous dairy cows in early lactation. J Dairy Sci 2007; 90(7): 3397–409.

183. Vandehaar MJ, Yousif G, Sharma BK, et al. Effect of energy and protein density of prepartum diets on fat and protein metabolism of dairy cattle in the periparturient period. J Dairy Sci 1999; 82(6): 1282–95.

184. Vanholder T, Leroy JL, Soom AV, Opsomer G, Maes D, Coryn M, de Kruif A. Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation in vitro. Anim Reprod Sci 2005; 87(1/2): 33–44.

185. Villard D, Arthur JR, Gonzalez JM, Pallares FJ. Selenium status in cattle: Interpretation of laboratory results. Bovine Pract. 2002; 36(1): 73–80.

186. Weiss WP, Hogan JS, Todhunder DA, Smith KL. Effect of vitamin E supplementation in diets with low concentration of Se on mammary gland health of dairy cows. J Dairy Sci 1997; 80(8): 1728–37.

187. Weiss WP. Requirements of fat-soluble vitamins for dairy cows: a review. J Dairy Sci. 1998;81(9): 2493–501.

188. Wheelock JB, Rhoads RP, VanBaale MJ, Sanders SR, Baumgard LH. Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. J Dairy Sci 2010; 93 (2): 644–55.

189. Wilde D. Influence of macro and micro minerals in the periparturient period on fertility in dairy cattle. Anim Reprod Sci 2006; 96: 240–249.

190. Williams EJ, Fischer DP, Noakes DE, et al. Factors in the resumption of ovarian activity and uterine involution in postpartum dairy cows. Anim Reprod Sci 1995; 38(3), 203–14.

191. Wolf R, Wolf D, Ruocco V. Vitamin E: the radical protector. J Eur Acad Dermatol Venerol 1998; 10(2): 103–17.

192. Yamauchi M, Nakahara T, Hashimoto K, Inui S, Maruyama Y, AsayamaT . Studies on the treatment of the silent heat in the cow with progesterone and estrogen. Jpn J Anim Reprod 2002;

4(4): 167–70.

193. Zagrodzki P, Barton H, Walas S, et al. Selenium status indices, laboratory data, and selected biochemical parameters in end-stage renal disease patients. Biol Trace Elem Res 2007; 116(1): 29–41.

194. Zduńczyk S, Janowski, T, Barański W in Raś-Noryńska M. Effects of silent heat and their treatment with PGF(2)alpha on reproductive indices in dairy cows. Rep Dom Anim 2009; 44(Suppl 1): 42.

195. Ziaie S, Jamaati H, Hajimahmoodi M, et al. The relationship between vitamin E plasma and BAL concentrations, SOD activity and ventilatory support measures in critically Ill patients. Iran J Pharm Res 2011; 10(4): 953–60.

196. Žust J, Pestevšek U, Vengušt A, Jakovac Strajn B. Patologija prehrane goved, malih prežvekovalcev, prašičev in perutnine. Izbrana poglavja iz higiene in patologije prehrane živali. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2009: 129–36.

11 PRILOGE

Tabela 15: Preliminarna analiza parametrov plodnosti za petletno obdobje, ločeno za zimo in poletje.
Table 15: Preliminary analysis of fecundity parameters for a five-year period, separately for winter and summer.

		Zima 2012 (N=30)		**Poletje 2012 (N=29)**	
		Število	Delež	Število	Delež
Uspešna osemenitev	PRVA usp.	17	56,67	14	48,28
	DRUGA usp.	4	13,33	5	17,24
	TRETJA usp.	5	16,67	5	17,24
	ČETRTA usp.	4	13,33	5	17,24
	IUO	1,87		2,03	
Parametri plodnosti		M		M	
	SI (št. dni)	46,54		57,89	
	SP (št. dni)	30,11		35,21	
	PP (št. dni)	69,23		81,21	
	DMT (št. dni)	365,21		369,23	
		Zima 2013 (N=31)		**Poletje 2013 (N=30)**	
		Število	Delež	Število	Delež
Uspešna osemenitev	PRVA usp.	17	54,84	14	43,33
	DRUGA usp.	7	22,58	7	26,67
	TRETJA usp.	3	9,68	6	20,00
	ČETRTA usp.	4	12,90	3	10,00
	IUO	1,71		1,93	
Parametri plodnosti		M		M	
	SI (št. dni)	45,37		51,78	
	SP (št. dni)	26,12		31,21	
	PP (št. dni)	67,35		75,1	
	DMT (št. dni)	352,35		360,1	
		Zima 2014 (N=28)		**Poletje 2014 (N=27)**	
		Število	Delež	Število	Delež
Uspešna osemenitev	PRVA usp.	16	57,14	13	48,15
	DRUGA usp.	7	25,00	7	25,93
	TRETJA usp.	3	10,71	3	11,11
	ČETRTA usp.	2	7,14	4	14,81
	IUO	1,68		1,93	
Parametri plodnosti		M		M	
	SI (št. dni)	47,63		54,89	

	SP (št. dni)	27,87		32,12	
	PP (št. dni)	67,01		76,23	
	DMT (št. dni)	352,35		360,1	
		Zima 2015 (N=29)		**Poletje 2015 (N=31)**	
		Število	Delež	Število	Delež
Uspešna osemenitev	PRVA usp.	16	55,17	16	51,61
	DRUGA usp.	8	27,59	10	32,26
	TRETJA usp.	4	13,79	3	9,68
	ČETRTA usp.	1	3,45	2	6,45
	IUO	1,66		1,71	
		M		M	
Parametri plodnosti	SI (št. dni)	43,21		52,12	
	SP (št. dni)	25,36		28,21	
	PP (št. dni)	68,21		75,22	
	DMT (št. dni)	347,21		360,1	
		Zima 2016 (N=28)		**Poletje 2016 (N=31)**	
		Število	Delež	Število	Delež
Uspešna osemenitev	PRVA usp.	17	60,71	16	51,61
	DRUGA usp.	6	21,43	7	22,58
	TRETJA usp.	4	14,29	6	19,35
	ČETRTA usp.	1	3,57	2	6,45
	IUO	1,61		1,81	
		M		M	
Parametri plodnosti	SI (št. dni)	46,89		52,37	
	SP (št. dni)	24,23		30,21	
	PP (št. dni)	64,23		69,23	
	DMT (št. dni)	345,35		358,22	
		Povprečna vrednost ZIMA		**Povprečna vrednost POLETJE**	
Uspešnost prve osemenitve		**56,91**		**48,60**	
IOU		**1,70**		**1,88**	
SI (št. dni)		**45,93**		**53,81**	
SP (št. dni)		**26,74**		**31,39**	
PP (št. dni)		**67,21**		**75,40**	
DMT (št. dni)		**352,49**		**361,55**	

Tabela 16: Preliminarna analiza pojavljanja reprodukcijskih motenj za petletno obdobje, ločeno za zimo in poletje.
Table 16: Preliminary analysis of the occurrence of reproductive disorders for a five-year period, separately for winter and summer.

		Patološko dogajanje							
		Endometritis		**Zaostala posteljica**		**Tiha pojatev**		**Ovarialne ciste**	
Skupina	Št. krav	N	%	N	%	N	%	N	%
Zima 2012	30	5	16,67	4	13,33	4	13,33	5	16,67
Poletje 2012	29	7	24,14	6	20,69	7	24,14	9	31,03
Zima 2013	31	5	16,13	4	12,90	1	3,23	5	16,13
Poletje 2013	30	6	20,00	7	23,33	3	10,00	8	26,67
Zima 2014	28	4	14,29	3	10,71	6	21,43	8	28,57
Poletje 2014	27	5	18,52	4	14,81	7	25,93	9	33,33
Zima 2015	29	5	17,24	5	17,24	5	17,24	7	24,14
Poletje 2015	31	7	22,58	6	19,35	4	12,90	8	25,81
Zima 2016	28	6	21,43	4	14,29	3	10,71	4	14,29
Poletje 2016	31	9	29,03	5	16,13	3	9,68	7	22,58
Skupaj ZIMA	**146**	**25**	**17,12**	**20**	**13,70**	**19**	**13,01**	**29**	**19,86**
Skupaj POLETJE	**148**	**34**	**22,97**	**28**	**18,92**	**24**	**16,22**	**41**	**27,70**

Tabela 17: Dnevne izmerjene vrednosti temperature zraka, relativne vlažnosti in ogljikovega dioksida v času izvajanja raziskave.
Table 17: Daily measured values of air temperature, relative humidity and carbon dioxide during the research.

Dan	ČAS	Tem. (°C)	RV %	CO_2 mg/L	ČAS	Tem. (°C)	RV %	CO_2 mg/L	ČAS	Tem. (°C)	RV %	CO_2 mg/L
1	10:00	24,3	77,3	565	13:00	26,8	60,7	498	18:00	27,4	63,4	541
2	10:00	25,7	72,5	557	13:00	27,1	66,6	623	18:00	26,9	77,5	635
3	10:00	27,1	72,6	697	13:00	29,2	73,2	673	18:00	27,3	77	571
4	10:00	28,2	77,5	495	13:00	31,3	74,1	552	18:00	30,1	82,1	673
5	10:00	28,4	79,4	605	13:00	30,4	79,3	667	18:00	28,1	79,2	498
6	10:00	18	82,8	525	13:00	21,1	84,7	749	18:00	18,9	84,1	625
7	10:00	18,6	70,4	596	13:00	19,6	69,2	492	18:00	19,1	72,4	502
8	10:00	18,1	75,1	702	13:00	21,6	64	543	18:00	19,3	67,3	547
9	10:00	19,7	67,2	468	13:00	22,7	60,9	462	18:00	23,7	69	431
10	10:00	21,3	70	533	13:00	24,2	71,9	498	18:00	21,2	70,6	496
11	10:00	19,6	84,3	547	13:00	22,3	80,6	583	18:00	19,8	85,5	579
12	10:00	17,8	80,1	575	13:00	19,3	67	493	18:00	20,1	66,9	496
13	10:00	18,2	81,1	570	13:00	18,7	76,9	517	18:00	20,4	78,6	544
14	10:00	19,3	87,2	563	13:00	19,6	83,6	554	18:00	19,3	89,6	525
15	10:00	18,2	85,2	575	13:00	20,1	65,2	500	18:00	17,7	81,5	541
16	10:00	17,3	76	517	13:00	19,7	61,3	521	18:00	19,1	68,3	540
17	10:00	18,2	78,1	485	13:00	20,4	76,3	450	18:00	20,6	74	488
18	10:00	19,7	94,6	504	13:00	22,6	78	487	18:00	19,9	78,2	531
19	10:00	18,2	66,1	459	13:00	22,7	61,4	588	18:00	20,8	65,1	571
20	10:00	18,6	69,7	531	13:00	21,6	64,2	513	18:00	21,8	62,7	543
21	10:00	25,3	61,6	715	13:00	26,6	63,2	701	18:00	26,9	64,2	667
22	10:00	25,3	69,1	640	13:00	27,3	66,5	633	18:00	28,7	63,4	600
23	10:00	28,1	61,4	520	13:00	29,7	68,5	498	18:00	28,9	70,9	579
24	10:00	28,9	80,3	667	13:00	31,8	73,6	579	18:00	29,1	89,8	661
25	10:00	31,1	76,5	612	13:00	37,2	90,2	583	18:00	35,2	56,8	589
26	10:00	21,9	52,6	755	13:00	24,3	65,1	562	18:00	24,3	62,8	700
27	10:00	23,1	70,3	770	13:00	23,7	69,9	564	18:00	23,7	72,6	523
28	10:00	22,6	80,9	548	13:00	25,7	69,9	564	18:00	22,7	71,5	433
29	10:00	21,3	83,2	557	13:00	23,6	74,5	588	18:00	22,8	77,4	497
30	10:00	21,2	89,5	581	13:00	22,5	87,7	570	18:00	22,6	85,7	532
31	10:00	21,8	86,1	567	13:00	26,1	87,7	570	18:00	22,4	77	604