Koncentracija vitamina A i beta karotena u plazmi sisajuće teladi

Pamić, Santina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:222493

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

KONCENTRACIJA VITAMINA A I β-KAROTENA U PLAZMI SISAJUĆE TELADI

DIPLOMSKI RAD

Santina Pamić

Zagreb, siječanj 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Hranidba životinja i hrana

KONCENTRACIJA VITAMINA A I β-KAROTENA U PLAZMI SISAJUĆE TELADI

DIPLOMSKI RAD

Santina Pamić

Mentor: prof. dr. sc. Darko Grbeša

Zagreb, siječanj 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, Santina Pamić, JMBAG 0178096120, rođena dana 08.02.1995. u Puli, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

KONCENTRACIJA VITAMINA A I β-KAROTENA U PLAZMI SISAJUĆE TELADI

Svojim potpisom jamčim:

- jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Santine Pamić,** JMBAG 0178096120, naslova

KONCENTRACIJA VITAMINA A I β-KAROTENA U PLAZMI SISAJUĆE TELADI

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:		potpisi:
1.	prof. dr. sc. Darko Grbeša, mentor	_____
2.	doc. dr. sc. Kristina Kljak, član	_____
3.	izv. prof. dr. sc. Krešimir Salajpal, član	_____

ZAHVALA

Ovim putem zahvaljujem se svojoj obitelji, prijateljima i dečku na velikoj podršci i pomoći tijekom studiranja. Hvala docentici Kristini Kljak na velikom trudu i strpljenju te savjetima tijekom odrađivanja analitičkog dijela u laboratoriju Zvaoda za hranidbu životinja. Posebno hvala mentoru, profesoru Darku Grbeši na uloženom trudu tijekom svih ovih godina studiranja na svojem prenesenom velikom znanju kako u teoriji tako i u praksi. Hvala i profesoru Krešimiru Salajapalu te svim ostalim zaposlenicima Agronomskog fakulteta.

Sadržaj

1. Uvod 1
2. Hipoteza i cilj istraživanja 2
3. Pregled literature 3
3.1. Vitamini 3
3.2. Vitamin A 4
3.2.1. β-karoten 5
3.2.2. Biodostupnost vitamina A 5
3.2.3. Aktivnost vitamina A 7
3.2.4. Funkcije vitamina A 8
3.2.5. Manjak vitamina A 9
3.2.6. Višak vitamina A 10
3.3. Vitamin A u hranidbi krava 11
3.3.1. Krave u laktaciji i suhostaju 11
3.4. Vitamin A i β-karoten u teladi 12
3.4.1. Proljev 13
3.4.2. Uloga vitamina A u sprječavanju pojave proljeva 14
3.5. Vitamin A u mlijeku, mliječnim zamjenicama i starteru 14
3.5.1. Mlijeko 16
3.5.2. Kolostrum 14
3.5.3. Faktori koji utječu na kvalitetu i iskorištenje kolostruma 14
3.5.4. Mliječna zamjenica 17
3.5.5. Starter 18
3.6. Vitamin A i karotenoidi u krmi 19
3.7. Sintetski vitamin A spojevi 19
3.8. Veza između vitamina A u kolostrumu i plazmi 20
4. Materijali i metode 21
4.1. Pokus sa životinjama 21
4.1.1. Uzorkovanje 21
4.2. Hranidba teladi u pokusu 22
4.3. Ekstrakcija i kvantifikacija β-karotena i retinola u plazmi i hrani teladi 24
4.4. Statistička obrada podataka 28
5. Rezultati i rasprava 29
5.1. β-karoten i retinol u plazmi i kolostrumu teladi 29

5.2. β-karoten i retinol u plazmi teladi trećeg dana starosti i u prijelaznom mlijeku 30
11.3. β-karoten i retinol u plazmi teladi starih 21 i 42 dana 31
5.4. Povezanost koncentracije retinola i β-karotena u hrani i plazmi teladi..... 33
5.5. Promjena koncentracije retinola i β-karotena u plazmi i hrani sa starošću teladi..... 34
6. Zaključak 38
7. Literatura 39
8. Prilozi 45

SAŽETAK

Diplomskog rada studentice **Santine Pamić**, naslova

KONCENTRACIJA VITAMINA A I β-KAROTENA U PLAZMI SISAJUĆE TELADI

Vitamin A (retinol) i β-karoten bitni su mikronutrijenti kod teladi jer njihova dovoljna koncentracija u organizmu povećava postotak preživjele teladi. Koncentracija retinola i karotenoida u plazmi teladi se promjenom hrane povisuje ili snizuje, stoga je cilj ovog istraživanja bio utvrditi promjene u koncentraciji vitamina A i β-karotena u plazmi i hrani teladi do 42. dana starosti. Pokus je proveden na 12 teladi s farme visokomliječnih krava „Kapelna“ hranjene istim izoroteinskim i izoenergetskim obrocima. Krv je vađena na dan rođenja, nakon uzimanja kolostruma, te 3., 21., i 42. dana starosti, a istih dana uzeti su uzorci kolostruma, mlijeka, mliječne zamjenice i starter smjese kojima je telad hranjena. β-karoten i retinol su iz uzoraka ekstrahirani heksan i kvantitativno određeni HPLC metodom obrnute faze. Koncentracije β-karotena i retinola u kolostrumu su u prosjeku iznosile 73 i 137,3 µg/dL, u prijelaznom mlijeku 9,5 i 27,9 µg/dL, mliječnoj zamjenici 5,2 i 6µg/dL, dok je njihov sadržaj u starteru bio 16,4 i 57µg/g ST. Koncentracije β-karotena i retinola u plazmi prvog dana su u prosjeku iznosile 14,3 i 9µg/dL, trećeg dana 4,9 i 7,3µg/dL, 21. dana 7,4 i 8,4 µg/dL i 42. dana 3,9 i 9,8 µg/dL. Koncentracija β-karotena i retinola u hrani utjecala je na koncentraciju β-karotena i retinola u plazmi. Najvišu koncentraciju vitamina A sadržavao je kolostrum pa je i najviša koncentracija bila u plazmi tek rođene teladi. Telad s najnižom koncentracijom vitamina A u plazmi uginula je tijekom pokusnog razdoblja.

Ključne riječi: vitamin A (retinol), β-karoten, telad, plazma

SUMMARY

Of the master's thesis – student **Santina Pamić,** entitled

CONCENTRATION OF VITAMIN A AND β-CAROTENE IN PLASMA OF SUCKLING CALVES

Vitamin A (retinol) and β-carotene are important micronutrients in calves since their adequate concentration in organism increases their survivability chances. Retinol and β-carotene concentrations in plasma of calves vary with the change of diet, and therefore, this study aimed to determine variations of vitamin A and β-carotene concentrations in plasma of calves up to 42 days of age. The animal trial was conducted on 12 calves at high milk production dairy farm „Kapelna" fed the same isoprotein and isoenergetic diets. Blood samples were taken on the first (after calves drank colostrum), third, 21st and 42nd day of calves age, and at the same days, samples of diets (colostrum, milk, milk replacers, and starter feed mix) fed to calves were also taken. β-carotene and retinol were extracted with hexane from all samples and quantified using reverse phase HPLC method. Concentrations of β-carotene and retinol in colostrum were on average 73 and 137.3 µg/dL, in milk 9.5 and 27.9 µg/dL, milk replacer 5.2 and 6 µg/dL, while their content in starter mix was 16.4 and 57 µg/g DM, respectively. Concentrations of β-carotene and retinol in plasma of new-born calves were 14.3 and 9 µg/dL, on the third day of age 4.9 and 7.3µg/dL, on 21st day 7.,4 and 8.4 µg/dL and on 42nd day 3.9 and 9.8 µg/dL, respectively. β-carotene and retinol concentrations in the diet affected their respective concentrations in blood plasma of calves. Colostrum had the highest concentration of vitamin A and thus the highest concentration was in new-born calves. Calves with the lowest vitamin A concentration in plasma died before end of the trial.

Keywords: vitamin A (retinol), β-carotene, calves, plasma

1. Uvod

Za pravilan rast i razvoj osim makronutrijenata – proteina, masti i ugljikohidrata, potrebni su i mikronutrijenti odnosno vitamini i minerali. Vitamine životinje ne mogu sintetizirati u dovoljnoj količini stoga ih je potrebno unositi putem hrane.

Vitamin A je vitamin topljiv u mastima. Krave ga najčešće unose u organizam putem krmiva, krmnih smjesa i dodataka u obliku provitamina β-karotena, dok je kod teladi primarni izvor vitamina A kolostrum, mlijeko i mliječna zamjenica, a kasnije kruta hrana - starter. Viši udio lista ima i viši udio β-karotena pa se paša, zelena krma i leguminoze smatraju najboljim krmivima izvorima vitamina A za krave. Također, treba imati na umu, prilikom skladištenja krme, da su karoteni osjetljivi na oksidaciju tijekom procesa prosušivanja te njihova koncentracija prilikom sušenja i skladištenja krme opada.

Mliječne krave koriste vitamin A za održavanje i proizvodnju mlijeka, a optimalnim unosom smanjen je i rizik od mastitisa, pobačaja i zaostajanja posteljice. Dakako, manjak ili višak vitamina negativno utječe na zdravlje krave, a samim time i na zdravlje teladi pa je tako pravilan i izbalansiran obrok ključan faktor u smanjenju uginuća teladi i ekonomskog gubitka.

Novorođena telad sklona je manjku vitamina A što dovodi do ranog uginuća, a kako bi se to izbjeglo potrebno je pratiti koncentraciju vitamina A u plazmi teladi i hrani koju konzumira. Smanjena konzumacija kolostruma dovodi do smanjene koncentracije vitamina A u krvi teladi, što doprinosi slabijem razvoju pasivnog imuniteta a time i pojavu infekcija i proljeva koji su primarni uzrok uginuća teladi.

2. Hipoteza i cilj istraživanja

Na temelju pretražene literature, hipoteza ovog istraživanja je:

Koncentracija vitamina A i β-karotena u plazmi sisajuće teladi opadati će s njihovim starenjem i promjenom hranidbe.

Na temelju postavljenje hipoteze, cilj ovog istraživanja je analizirati koncentraciju vitamina A i β-karotena u kolostrumu, prijelaznom mlijeku, mliječnoj zamjenici i starteru te njihovu biodostupnost u plazmi teladi stare 1, 3, 21 i 42 dana.

3. Pregled literature

3.1. Vitamini

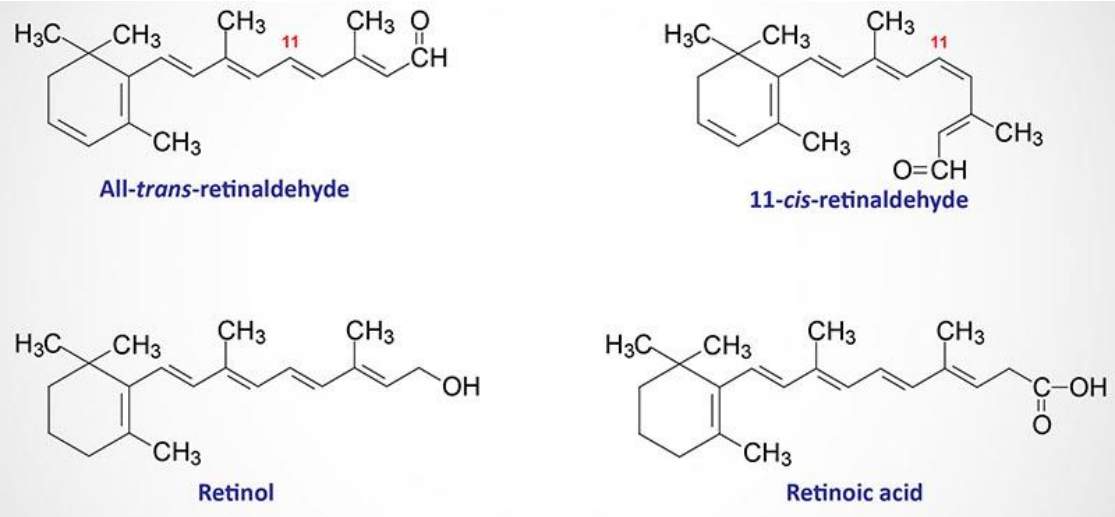
Vitamini su bitne organske hranjive tvari koje životinje ne mogu sintetizirati u dovoljnoj količini, a potrebne su im za normalno odvijanje brojnih fizioloških funkcija bitnih za život. Danas se smatra da ljudi i domaće životinje trebaju trinaest vitamina, a oni se dijele u dvije veće grupe: vitamine topljive u polarnim lipidima (A, D, E i K), te vitamine topljive u vodi (tiamin B_1, riboflavin B_2, niacin B_3, pantotenska kiselina B_5, piridoksin B_6, biotin B_7, folna kiselina B_9, cijanokobalamin B_{12}, i vitamin C). Nadalje, za razliku od drugih hranjivih tvari životinje ih trebaju u izrazito malim količinama, nemaju strukturnu funkciju niti su izvor energije. Fiziološke funkcije vitamina su strogo specifične i manjak dovodi do specifičnih znakova deficijencije i u pravilu se simptomi otklanjaju dodavanjem vitamina. Vitamine stvaraju biljke i uskladišteni su u mlijeku i trebaju metaboličku aktivaciju da bi oni mogli funkcionirati u organizmu. Sljedeće svojstvo vitamina je visoka osjetljivost vitamina topljivih u mastima te nekih vitamina topljivih u vodi (B_1, B_3, B_6, i B_{12}) na oksidaciju, toplinu, svjetlost, određene metale koji ih razaraju tijekom skladištenja i prerade hrane i tako smanjuju njihovu biološku aktivnost. Svi vitamini imaju navedena opća svojstva iako se međusobno razlikuju po kemijskoj građi i funkcionalnim svojstvima (Combs i McClung, 2017).

Ova opća definicija ima dosta izuzetaka. Naime, neki vitamini, imaju samo dio zajedničkih svojstava. Pa tako ih nekoliko služi kao kofaktori enzima poput vitamina A, K, C, tiamin, riboflavin, piridoksina, pantotenska kiselina i cijanokobalamin. Nadalje vitamin E i C su antioksidansi dok su kofaktori u metaboličkim oksidacijsko redukcijskim reakcijama vitamin E, K, C, niacin, riboflavin i pantotenska kiselina. Hormoni su vitamini A i D, oni su prva skupina tvari za koje se navode da pokazuju svojstva hormona kože, kao što su aktivacija, inaktivacija i eliminacija u specijaliziranim stanicama tkiva, vrše biološke aktivnosti, otpuštaju se u cirkulaciju, a vitamin A je i zaštitni faktor vida (Reichard, 2007; Combs i McClung, 2017). Isto tako neke životinje mogu sintetizirati neke vitamine. Pa tako većina životinja sintetizira vitamin C dok vitamin D nastaje u koži izloženoj dovoljno vremena sunčevim zrakama. Samo perad i štakori ne mogu dok ostale životinje mogu sintetizirati kolin (Combs i McClung, 2017).

Hranom sve vrste životinja trebaju dobiti vitamine topljive u mastima, a preživači zdravog probavnog sustav dobivaju dovoljne količine vitamina topljivih u vodi i vitamina K iz mikorba predželudaca.

3.2. Vitamin A

Vitamin A (Slika 1) je generički naziv za sastojke koji imaju biološku aktivnost retinola. Ti spojevi sadrže cikloheksanski prsten na kojem su tri metilne skupine i pobočni lanac s četiri dvostruke veze te primarnom –OH skupinom (Wikipedia, 2017).



Slika 1. Strukture glavnih komponenata vitamina A
Izvor: https://themedicalbiochemistrypage.org/vitamins.php

Vitamin A u prirodi dolazi kao alkohol u obliku retinola, aldehid u obliku retinala i kao karboksilna retinoična kiselina. Retinol se najčešće nalazi u tkivima u esterificiranom obliku poput palmitata te u manjoj količini u obliku stearata i oleata. Esterifikacija štiti hidroksilne skupine od oksidacije i značajno mijenja molekularna svojstva. Retinil je narančasta viskozna tekućina poput ulja te se ubraja u vitamine topljive u mastima. Ovaj se vitamin otapa u alkoholu i biljnim uljima dok u vodi i glicerolu ne. Toplina mu može smanjiti aktivnost, a relativno se brzo razgrađuje djelovanjem dnevne i ultraljubičaste svjetlosti, temperature, vlage, te redoks potencijala hrane u koju je umiješan. Retinil esteri (npr. retinil palmitat) obično su pomiješani u tkivima s trigliceridima i drugim neutralnim lidipidima uključujući i antioksidans α-tokoferol. Oni su glavni oblik vitamina A u tijelu i dominantni oblik (95%) u hilomikronima, staničnim lipidnim kapljicama i globulima mliječne masti, a također su i glavna forma u hrani animalnog podrijetla (Zempleni i sur., 2007).

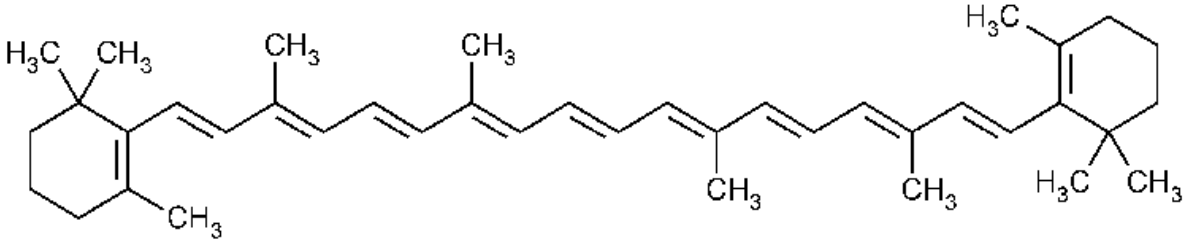
Retinal je neposredni proizvod središnjeg cijepanja β-karotena, kao i međuprodukt u oksidacijskom metabolizmu retinola u retinoičnu kiselinu. Bitno je napomenuti da se 11-*cis* izomer retinala formira u mrežnici oka te tako sudjeluje u stvaranju vizualnih pigmenata, rodopsina u štapićima i jodopsina u čunjićima. Dok se retinol i retinal skladište, retinoična kiselina se ne skladišti u tjelesnim tkivima (Zempleni i sur., 2007).

Ljudi i životinje moraju unositi vitamin A konzumacijom animalnih proizvoda, dodataka te pretvorbom α- i β-karotena te β-kriptoksantina iz biljaka. Za ljude su glavni izvori vitamina A mlijeko, meso i jaja u kojima se on nalazi u nekoliko oblika, uglavnom kao estera dugolančanih masnih kiselina od kojih je najznačajniji retinil palmitat (Combs i McClung, 2017). Za mladunce sisavaca pa tako i telad glavni izvori vitamina A su majčino mlijeko i mliječna zamjenica te kasnije krmna smjesa.

3.2.1. β-karoten

Karotenoidi su velika grupa prirodnih tetraterpenoidnih pigmenata koje sintetiziraju fotosintetski organizmi kao što su biljke, alge, gljive i bakterije, dajući im žutu, narančastu i crvenu boju. Životinje ne mogu sinteizirati kako vitamin A tako i karotenoide pa ih moraju unositi hranom. Karotenoidi kao vitalni sastojci hrane domaćih životinja imaju tri glavne uloge: dio ih je prekusor za sintezu vitamina A, dok su svi antioksidansi i bojila tkiva životnja.

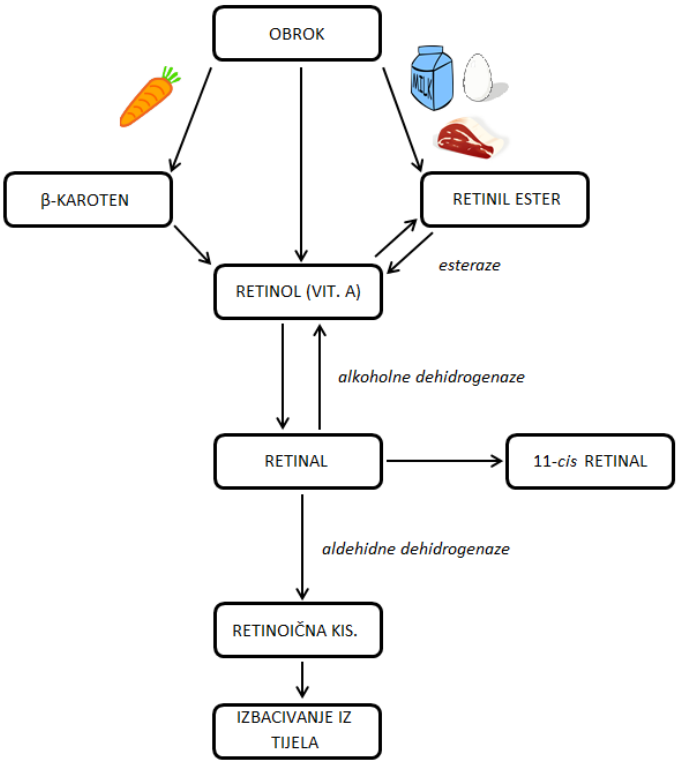
U prirodi postoji 400 – 700 karotenoida, ovisno o izvoru literature, a tipična hrana domaćih životinja i ljudi sadrži do 40 karotenoida. Prema kemijskoj strukturi, karotenoidi se dijele u karotene i ksantofile. Najzastupljeniji karoteni u hrani preživača su β-karoten (Slika 2), α-karoten te ksantofil β-kriptoksantin, a svi se mogu konvertirati u retinol. Ksantofili lutein i zeaksantin ne prelaze u vitamin A (Cuttriss i sur., 2011). Preživači najveći dio karotenoida, dominantno β-karoten dobivaju iz voluminozne krme bogate listom te dio iz kukuruza.



Slika 1. Strukturna formula β-karotena
Izvor: http://www.newdruginfo.com/pharmacopeia/usp28/v28230/usp28nf23s0_m8730.htm

3.2.2. Biodostupnost vitamina A

Opskrba krava i teladi vitaminom A ovisi od količine u hrani i njegove biodostupnosti (Slika 3). Karotenoidi u biljnoj harani su „zarobljeni“ u proteinu, a animalnoj hrani u masnoćama pa biodostupnost ovisi od visine oslobađanja (probave) iz matrice hrane dok apsorpcija ovisi od zdravlja probavnog traka i prisutnosti masnoće, a transport o količini retinol vezujućeg proteina.



Slika 3. Metabolizam vitamina A i β-karotena
Izvor: Li, 2014

Uneseni karotenoidi se prvo oslobađaju iz matrice hrane u buragu gdje ih dalje razgrađuju mikroorganizmi buraga. U buragu se razgrađuje 67% vitamina A na obroku koncentratne krme i 18% obroku voluminozne krme (McDowell, 2008). Sukladno visokoj buražnoj razgradnji vitamina A na koncentratnom tipu obroka, najnoviji francuski normativi INRA (2018) preporučuju da obrok mliječnih krava koje se hrane s do 40% koncentrata sadrži vitamina A u koncentraciji od 6 000 IJ/kg ST, a obrok s > 60% koncentrata sadrži 9 000 IJ/kg ST. Apsorpcija sintetskog retinil estera u crijevima je 70-90% i odvija se u prvom dijelu tankog crijeva (EFSA, 2013).

Karotenoidi se apsorbiraju u enterocite i tada djelomično prerađuju u retinol dok se retinil esteri prije apsorpcije u enterocite hidroliziraju do retinola pomoću pankreasne hidrolaze (esteraze) ili lipidne hidrolaze koje se nalaze na površini mikroresica crijevnih stanica (Harrison, 2005). Žuč i lipidi iz hrane olakšavaju apsorpciju, a retinil esteri moraju biti

dio lipidne micele kako bi se apsorbirali. Micelarne strukture poboljšavaju prolaz u mikroresice crijevnih stanica. Također, lipidne micele povećavaju unos karotenoida u crijevne stanice. Na biodostupnost i probavu vitamina A i karotenoida utječe cjelokupni unos putem hrane te integritet crijevnih stanica. Apsorpcija kod većine životinja je 70-90%, ali učinkovitost apsorpcije za karotenoide dodane u obrok je 40-60%, ovisno o tipu karotenoida. Karotenoidi koji se nalaze u kloroplastima su nisko apsorptivni (<10%) zbog loše probavljivosti kloroplasta i otpuštanja karotenoida iz njih.

U crijevnoj sluznici retinal se reducira pomoću dehidrogenaze u retinol te se onda ponovo esterificira odnosno ulazi u reakciju s masnim kiselinama te opet nastaje retinil ester. Retinol se dalje spaja sa hilomikronima i otpušta u limfu. Hilomikroni se limfom prenose do jetre gdje se oko 75% derivata retinola oslobađa. U jetri dolazi do „razmjene“ retinila i ostalih retinoida sa Itovim i parenhimskim stanicama. Itove stanice pohranjuju 50-80% ukupne količine vitamina A u tijelu, reguliraju njegovo prenošenje i pohranu (Blomhoff i Blomhoff, 2006). Više od 95% vitmina A u Itovim stanicama je prisutno u lipidnim kapljicama kao ester retinil palmitat, koji je skladišna forma vitamina A (Blomhoff i sur.,1990).

Budući tijelo treba vitamin A, retinil ester u jetri je hidroliziran i otpušten u krv u formi retinola koji je vezan za protein kao kompleks retinol-protein (eng. retinol binding protein - RBP) što znači da je jedna molekula vitamina A povezana s jednom molekulom RBP-a. Kada se taj kompleks otpušta u krv može povezati s još jednim proteinom, transtiretinom, koji veže na sebe tiroksin, a nakon toga slijedi prijenos do ciljanih stanica. Ciljane stanice vitamina A su najčešće fetalne epidermalne stanice, stanice gastro-intenstinalne sluznice, reproduktivnog trakta, plućne sekretorne stanice te stanica slinovnica (Debier i Larondulli, 2005., Harrison, 2005).

Goveda za razliku od koza i ovaca, te ovisno od pasmine lošije pretvaraju provitamin A karotenoide u retinol te se oni nakupljaju u tjelesnim masnoćama i mlijeku. Karoteni se nakon buraga prvo rascijepaju u retinal djelovanjem β-karoten 15,15' monooksigenaze u enterocitima pa zatim u retinol u stjenci crijeva koji se dalje skladišti u jetri (Reboul i sur., 2006). U preživača, ljudi i svinja neki apsorbirani karotenoidi izbjegnu crijevnu konverziju te netaknuti ulaze u krvotok te daju boju mesu, masnoći i mlijeku (Vogel i sur., 1999). Karotenoidi koji ne prijeđu u retinal u enterocitima ugrade se u hilomikrone i u toj formi se nalaze u limfnoj cirkulaciji i jetri pa tako dio β-karotena koji ne prijeđe u vitamin A ima značajnu ulogu u reprodukciji mliječnih krava (Kawashima i sur., 2012). U jetri krava se nalazi 90% uskladištenog retinola i β-karotena te one mogu biti tolike da podmiruju čak šestomjesečne potrebe biljojeda (McDowell, 2000). U mliječnih krava se većina vitamina A izlučuje kao retinil ester dok se u peradi u jajima skladište retinol i retinal (Irie i sur., 2010).

3.2.3. Aktivnost vitamina A

Biološko djelovanje prirodnih i sintetskih spojeva se preračunava na vitamin A djelovanje retionida. Grbeša (2017) navodi da je 1 IJ (internacionalna jedinica) vitamina A biološka aktivnost 0,3 µg kristaliničnog vitamin A alkohola, 1 mg sadrži 3333 IJ vitamina A (1000/0,3), 0,344 µg kristaliničnog vitamin A acetata, 1 mg 2907 IJ sadrži (1000/0,344), 0,55 µg kristaliničnog vitamin A palmitata, 1 mg sadrži 1818 IJ vitamina A (1000/0,55), 0,359 µg kristaliničnog vitamin A propionata i 1 mg sadrži 2785,5 IJ vitamina A (1000/0,359).

Dodatni razlog izražavanja sadržaja vitamina A u međunarodnim jedinicama je činjenica da β-karoten različito pretvaraju u vitamin A pojedine vrste domaćih životinja. Tako goveda iz 1 mg β-karoten dobiju 400 IJ vitamina A, konji 155, a ovce i koze 500 – 600 IJ (Nozière i sur., 2006).

Danas se koristi kao jedinica aktivnosti sintetskih vitamin A spojeva i retinol ekvivalent (RE) koji odgovara vitamin A djelovanju 1 µg retinola ili sadrži 3,03 IJ vitamina A (Tablica 1).

Tablica 1. Aktivnost 1 mg vitamin A spojeva (EFSA, 2013)

Spoj	RE	IJ/mg
All **(E)-retinol**	1	3333
All **(E)-retinol actetat**	0,87	2906
All **(E)-retinol palmitat**	0,55	1932
All **(E)-retinol propionat**	0,84	2789

3.2.4. Funkcije vitamina A

Poznato je više funkcija vitamina A u koje se ubrajaju (Debelo i sur., 2017):

1.) održavanje normalnog epitela tkiva (kože, tankog crijeva, bubrega, krvnih žila, maternice, placente, muškog reproduktivnog trakta, pluća);
2.) podržavanje spermatogeneze, preživljavanja embrija, rasta i razvoja fetusa
3.) sinteza glikoaminoglikana i rast oesteoklasta;
4.) hepatopoeza;
5.) razvoj limfnih organa;
6.) proizvodnja antitijela od strane B – limfocita i imuni odgovor na patogene te
7.) intracelularna komunikacija

Karotenoidi kao što su lutein, likopen i zeaksantin nemaju vitamin A djelovanje, ali služe kao antioksidansi i bojila animalnih proizvoda kao što su mlijeko, kljun peradi, potkožna mast i žutanjak jaja te boja perja ukrasnih ptica i mesa lososa. Najpoznatije funkcije β-

karotena je uloga provitamina i antioksidansa. Skupno gledano, vitamin A je bitan za vid, razvoj i rast stanica (osobito epitelnih), preživljavanje zametka i imunozaštitu (Wu, 2018).

Tablica 2. Pojedinačne funkcije vitamin A spojeva (Engelking, 2014)

Spoj	Funkcija	Djelovanje
Retinol i retinal	Vid	Sinteza rodopsina Sinteza porfiropsina
Retinoična kiselina	Rast i diferencijacija epitelnog tkiva	Sinteza glikoproteina Ekspresija/produkcija hormona rasta Produkcije mukoze
	Remodulacija kostiju	
	Reprodukcija	Spermatogeneza Razvoj plancente Održavanje funkcije žutog tijela
	Surfaktant pluća	Produkcija fosfolipida
	Stimulacija diferencijacije mileoidnih stanica u granularne leukocite	
	Induciranje transglutaminaza	Unakrsno povezivanje proteina koje je bitno za funkcioniranje makrofaga, grušanje krvi i adhezije stanica

3.2.5. Manjak vitamina A

Primarni uzrok manjka vitamin A je nedovoljni unos što se događa u preživača na oskudnoj i siromašnoj paši tijekom suše te oni koji unose visok udio žitarica putem obroka i nemaju adekvatan pristup zelenoj ispaši ili im hrana nije dopunjena sintetskim vitaminom A. Sekundarni uzrok manjka vitamin A može biti uzrokovan bolestima jetra i crijeva, nedovoljnom biodostupnosti uzrokovanom manjkom fosfata te proteina u hrani što može dovesti do manje sinteze retinol vezujućeg proteina, a rezultira lošijom apsorpcijom i transportom vitamin A (Parker i sur., 2017). Također, prisutnost antagonista kao što su nitrati, klorirani naftaleni te visoke temperature smanjuju transport vitamina A (Lotfollahzadeh, 2015). Suprotno, znatne količine vitamin A i β-karotena se pri njegovoj visokoj koncentraciji u hrani (paša, injekcije) skladišti u jetri i može se iskoristiti tijekom dužeg (3-4 mj.) razdoblja njegove nestašice (CSIRO, 2007).

Osnovni znakovi manjka vitamin A su poremećaj vida te smanjenje broja mukosa sekrecijskih stanica i zamjena epitelnih stanica s tankim slojevima rožnatog, višeslojnog epitela kod organa. Ova keratinizacija obuhvaća epitel rožnice (kseroftalmija), pluća, kožu (ljuskavost kože) i mukozu crijeva (Engelking, 2014). Isto tako smanjena je i sinteza glikoproteina. Naime, oštećene sluznice ne proizvode dovoljno sluzi čiji nedostatak pogoduje invaziji patogenih organizama na membranu što slabi imuni mehanizam crijeva, pluća i maternice, a to dovodi do razvoja sekundarnih infekcija. Hipovitaminoza vitamina A u mliječnih krava dovodi do učestalije pojave mastitisa, metritisa, retencije posteljice i abortusa.

Deficit vitamina A dovodi do veće sklonosti infektivnim bolestima od kojih telad najviše pobolijeva i ugiba u razdoblju sisanja. Hipovitaminoza A čini telad osobito sklonom oboljenjima dišnih putova (rinitisi, bronhitisi, pneumonije) i proljevima. Znakovi nedostatka vitamina A su iscjedak iz nosa i očiju, poremećeno kretanje i noćno sljepilo. Isto tako telad zaostaju u rastu i imaju općenito lošija proizvodna svojstva. Manjak vitamina A u teladi dovodi do dermetopatije koja se uspješno liječi dodavanjem vitamin A u hranu (Baldwin i sur., 2012).

Zbog svega navedenog, a radi prevencije manjka, redovito se u mliječne zamjenice i sve krmne smjese za krave i telad dodaju sintetski pripravci vitamin A.

3.2.6. Višak vitamina A

Pojava i oštrina simptoma suviška vitamina A ovisi o vrsti i dobi životinja, tjelesnim rezervama, stupnju biodostupnosti i konverziji karotena. Simptomi trovanja su odbijanje unosa hrane – anoreksija, gubitak težine, zadebljana kože, ljuskava upala kože (dermatitis), nateknuti i krastavi očni kapci, mjestimičnim gubicima dlake, krvarenja, smanjena gustoća kostiju, spontani lomovi kostiju, zadebljanja korteksa kostiju i smrt (NRC, 2001).

Previše retinola prekida lipoproteine membrana stanica što povisuje njihovu permeabilnost – propusnost. Smanjena je apsorpcija vitamina E, D i K i njegova koncentracija u plazmi i jetri (NRC, 2001; EFSA, 2013). Smatra se da krave podnose veliku količinu vitamina A pa tek koncentracija od 66 000 IJ/kg ST djeluje toksično (INRA, 2018).

Teladi se daju pojačane koncentracije vitamina A zbog njegovog povoljnog djelovanja u zaštiti pluća i probavnog sustava. Međutim, visoke doze u mliječnoj zamjenici (> 30 000 IJ/kg ST) u prvom tjednu života su antagonisti vitaminu E te se i njegova razina mora povećati (Franklin i sur., 1998).

3.3. Vitamin A u hranidbi krava

Krave vitamin A dobivaju jedino putem obroka iz voluminozne krme, krmnih smjesa i dodataka. Nove francuske preporuke (INRA 2018) preporučuju 110 IJ vitamina A/kg tjelesne težine za mliječne i gravidne krave te 80 IJ/kg tjelesne težine za junice. Navedeno preračunato na težinu od 650 kg iznosi dnevno 71 500/d za mliječne krave. Ova količina vitamin A je dovoljna za podmirenje proizvodnje do 35 kg/d mlijeka. Visokomliječne krave (> 35 kg/d) trebaju višu razinu vitamina A u obroku i to 1 000 IJ/kg mlijeka iznad 35 kg (Weiss, 2014).

Isto tako visokmliječne krave se hrane visokim udjelom koncentrata pa i to povisuje potrebnu količinu vitamina A u obroku. Krave koje se hrane s do 40% koncentrata u ST obroka trebaju 4 200 IJ/kg ST obroka, a s više koncentrata trebaju i više 6 600 IJ/kg ST vitamina A (Meschy, 2007).

Istraživanje Michal i sur. (1994) dokazalo je da davanje vitamina A četiri tjedna prije telenja u dozi od 120 000 IJ /d smanjuje zaostajanje posteljice za 28% i mliječnu groznicu te povisuje djelovanje neutrofila. Istraživanje Oldham i sur. (1991) pokazalo je da krave hranjene sa 160 000 IJ/d daju puno više masnoće mlijeka tijekom prvih 42 dana laktacije od krava koje su hranjene 50 000 IJ vitamina A/d. Za goveda se smatra da su adekvatno opskrbljena vitaminom A ako mu je sadržaj retinola >20 µg/g u jetri (Thomas i Moore, 1952).

3.3.1. Krave u laktaciji i suhostaju

Laktacija je razdoblje kada krava luči mlijeko i ono započinje teljenjam, a završava zasušivanjem. Laktacija traje 305 dana te se pomoću laktacijske krivulje određuju hranidbene potrebe krave. Tijekom laktacije krava troši puno hranjivih tvari zbog ugradnje istih u mlijeko, samim time njihov unos mora se povećati.

NRC (2001) preporučuje 110 IJ vitamina A/ kg TM što u prosjeku je jednako 60 000-70 000 IJ/dan. Rode i sur.(1990) i Weiss i sur.(1995) demonstrirali su da je biodostupnost vitamina A smanjena 30-60% u obrocima koji sadrže više od 50% koncentrata. Njemačke preporuke (LfL, 2017) preporučuju da obrok mliječnih krava u punoj laktaciji sadrži 5 000 IJ vitamina A i 15 mg β-karotena što odgovara dnevnoj količini od 100 000 – 150 000 d/kravi pri visokoj konzumaciji obroka u punoj laktaciji (DSM, 2016).

Koncentracija vitamina A i β-karotena opada u krvi gravidnih krava s približavanjem teljenja što zahtjeva njihovo dodavanje u obrok. Tijekom tranzicije smanjuje se koncentracija vitamina A (Tjoelker i sur., 1988, Michal i sur.,1994 i Akar i Gazioglu, 2006). To smanjenje je jednim dijelom zbog gubitka vitamina A u kolostrumu. Zbog toga njemačke (LfL, 2017)

preporuke predlažu 10 000 IJ vitamina A i 30 mg/kg β-karotena u suhoj tvari obroka mliječnih krava u suhostaju što korespondira količini od 80 000 do 100 000 IJ po kravi dnevno (DSM, 2016).

Dahlquist i Chew (1985), Chew i Johnson (1985), i LeBlanc i sur. (2004) su dokazali da dodavanje vitamina A tijekom ranog suhostaja smanjuje pojavu mastitisa kod krava u laktaciji. Isto tako jednokratne injekcije od 2 00 0000 IJ u kasnom suhostaju povisuje koncentraciju retinola u plazmi novorođene teladi (Lotfollahzadeh, 2015).

3.4. Vitamin A i β-karoten u teladi

Novorođena telad je sklona manjku vitamin A što se vidi po brojnim simptomima deficijencije i niskoj razini vitamina A u krvi i niskoj koncentraciji vitamin A uskladištenog u jetri (Gallina i sur., 1970). Za novorođenu telad drži normalnom koncentracija manja od 10 µg/g u jetri (Hammell i sur., 2000). Uz nisku jetrenu koncentraciju vitamina A manjku vitamin A pridonosi i nedovoljna razina u kolostrumu majke koja je rezultat nedovoljnog unosa vitamina i provitamina tijekom graviditeta (Waldner i Blakley, 2014). Plazma novorođene teladi ima izrazito niske koncentracije (< 4 µg/dL) vitamina A i (< 0,4 µg/dL) β-karotena što je nekoliko desetaka puta manje od plazme krava koja sadrži 40 – 70 µg/dL retinola i više od 50 µg/dL β-karotena (Horst i sur., 1999).

Novorođena telad tovnih pasmina (1-7 dana starosti) s koncentracijom vitamina A u serumu manjom od 1,4 µg/dL ima 2,8 puta veću smrtnost od teladi koja ima normalnu razinu retinola (Waldner i Uehlinger, 2017). Isto tako visoki mortalitet u prvim danima života zabilježen je i kod teladi mliječnih pasmina u Švedskoj s niskom razinom β-karotena u krvi (Torsein i sur., 2011). Zbog toga je mjerenje koncentracije retinola u krvi krava prije i nakon teljenja te novorođene i sisajuće teladi preduvjet prevencije hipovitaminoze vitamina A (Raila i sur., 2017).

Odgoda u opskrbi iz kolostruma za više od 12h nakon teljenja utječe na razine β-karotena, vitamina A i vitamina E u plazmi tijekom prvog mjeseca života teladi (Zanker i sur., 2000; Debier i sur., 2005; Puvogel i sur., 2008). Ako je opskrba prikladnim količinama kolostruma bogatim vitaminom A nedovoljna, potrebna je dodatna suplementacija.

Suplementacija kod krava se treba postići s izvorima vitamina A, a ne β-karotenom zbog smanjene apsorpcije u crijevima (Yonekura i Nagao, 2007) ili smanjenog kapaciteta teladi za pretvorbu β-karotena u retinol (Nonnecke i sur., 2001). Uzevši u obzir ova istraživanja nameće se potreba za primjenom od minimalno 165-200 IJ/kg TM tijekom prvih mjeseci života kako bi se postigle normalne rezerve u jetri.

Dostupni podaci ukazuju da su NRC (2001) preporuke za telad (110 IJ/kg TM) prikladne, no ukoliko postoje sumnje o količini ili kvaliteti unosa kolostruma u teladi ili se telad nalazi u stresnim uvjetima, poput sustava intenzivne proizvodnje, preporuka se može povisiti na 134-200 IJ/kg TM bez riskiranja toksičnosti.

3.4.1. Proljev

Proljev u teladi čest je u dobi od pet dana do tri tjedna, nakon toga učestalost pojave opada. Uzroci proljeva se grupiraju u dvije skupine: infektivni i neinfektivni. Neinfektivni uzroci se često nazivaju čimbenicima koji pridonose ili se pojavljuju netom prije proljeva. Postoji povezanost između neinfektivnih i infektivnih uzroka, stoga sprječavanje infektivnih uzroka često je bez rezultata ukoliko se ne obrati pažnja na kontrolu neinfektivnih čimbenika.

Neinfektivni uzroci se najbolje definiraju kao mane u uzgoju koje se pojavljuju kao nutritivni nedostaci, neprikladni okoliš, nedovoljna pažnja pružena teladi ili bilo koja kombinacija istih. Najčešći neinfektivni problemi uključuju:

1.) Neprikladnu hranidbu gravidne krave, osobito tijekom zadnje trećine graviditeta. I kvaliteta i kvantiteta kolostruma značajno ovisi o koncentraciji energije i proteina kod krava u graviditetu. Nedostatak vitamina A i E su povezani s većim rizikom od proljeva.
2.) Neprikladan okoliš odnosno blatnjava površina u staji, prenapučenost, prezimljavanje i teljenje na istom području itd. su stresni za telad i povećavaju ulaz uzročnika proljeva u organizam teleta. Mokra i prehlađena telad brzo gubi tjelesnu toplinu, pod velikim je stresom i često nema snage za sisanje dovoljne količine kolostruma na početku života.
3.) Nedovoljno pružanje pažnje teladi, posebice tijekom teškog poroda ili nepovoljnih vremenskih uvjeta. Tele se rađa bez antitijela koja bi se borila protiv pojave proljeva i dobiva ih sisanjem kolostruma na početku života. Bilo koji napori za sprječavanje proljeva uporabom cjepiva nema koristi ukoliko tele ne siše kolostrum. Kako tele raste tako gubi sposobnost apsorpcije antitijela iz kolostruma.

Infektivni uzroci grupiraju se u:

1.) Bakterijske uzroke: *Escherichia Coli, Salmonella spp, Clostridium perfringens*
2.) Virusni uzroci: Rotavirus, Coronavirus, BVD virus, IBR virus
3.) Protozoe: *Cryptosporidium, Coccidia*
4.) Kvasci i plijesni

3.4.2. Uloga vitamina A u sprječavanju pojave proljeva

Iz kolostruma se dobiva ne samo bitan imunoglobulin već i značajna količina imunoloških proteina i nutrijenata koji štite telad prvih nekoliko dana života, a prijenos pasivnog imuniteta smanjuje učestalost i ozbiljnost proljeva (Quigley i sur., 1995). U istraživanju Kume i Toharmat (2000) suha tvar u izmetu teladi se smanjila nakon šest dana starosti i imala je raspon 11,7-40,6%, dok je raspon suhe tvari nakon teljenja bio 21,2-44,2%. Pojava proljeva i povišene tjelesne temperature česta je u prvih 1-3 tjedna života nakon što prestane apsorpcija imunoglobulina u crijevima teladi (Quigley i sur., 1995). Koncentracija β-karotena i vitamina A u plazmi je u pozitivnoj korelaciji sa suhom tvari izmeta što ukazuje na smanjenje vlage u izmetu odnosno pojave proljeva. Primijećeno je da telad koja je dobila nižu količinu β-karotena i vitamina A iz kolostruma imala veću stopu pojave proljeva i smrtnosti (Lotthammer, 1979).

Nadomjestak vitamina je potreban za telad koja dobiva kolostrum niske koncentracije β-karotena i vitamina A kako bi se održao njihov zdravstveni status netom nakon teljenja. Povećani nadomjestak vitamina A poboljšao je konzistenciju izmeta teladi starih 3-4 tjedna (Eicher i sur., 1994), no dodatni vitamin A koji se daje za liječenje proljeva može imati negativan utjecaj na telad koja već prima suplementaciju vitamina A (Franklin i sur., 1998).

3.5. Vitamin A u kolostrumu, mlijeku, mliječnim zamjenicama i starteru

3.5.1. Kolostrum

Kolostrum je bogat hranjivim tvarima pa samim time ima više suhe tvari (25,8%), mliječne masti (5,4%), bjelančevina (15%) te manje laktoze (3,3%). Telad je rođena bez razvijenog imunološkog sustava. Dok ne razviju sposobnost borbe protiv bolesti, ovise o pasivnom imunitetu koji dobivaju putem kolostruma od njihovih majki. Koncentracija vitamin A i β-karotena u kolostrumu je oko 5x veća, pa tako kolostrum sadrži vitamina A 233 do 369 µg/dL, a mlijeko 33 do 55 µg/dL (Debier i sur., 2005). Visoka razina vitamina A i β-karotena u kolostrumu nadoknađuje nisku koncentraciju u jetri (zalihe) teladi i loš prolaz kroz plancentu čime se osigurava brzi porast koncentracije vitamina A u krvi teladi.

3.5.2. Faktori koji utječu na kvalitetu i iskorištenje kolostruma

Za vrijeme graviditeta mliječnih krava, majčina i teleća opskrba putem krvi je potpuno razdvojena; nema prijenosa preko placente u fetus. Kao rezultat toga, tele se rađa s minimalnom imunološkom obranom protiv patogena iz okoliša pa potreban imunitet moraju dobiti konzumacijom kolostruma.

Postoji nekoliko faktora koji utječu na kvalitetu kolostruma pa kao prvo može se navesti metoda hranjenja. Puštanje teleta da siše svoju majku može uzrokovati velike probleme s konzumacijom kolostruma odnosno imunoglobulina. Približno 25-40% teladi koji sišu svoje majke ne konzumiraju adekvatne doze kolostruma zbog toga jer telad ima tendenciju piti male količine nakon rođenja. Tako neadekvatna konzumacija dozvoljava bakterijama da uđu i razmnožavaju se u crijevima, uzrokujući smrt. Često telad ne želi konzumirati preporučenu dozu kolostruma odmah nakon rođenja jer nemaju veliku potrebu za sisanjem. Drugi razlog da telad nerado siše je taj da nisu fizički sposobni konzumirati kolostrum zbog različitih problema pri teljenju kao npr. oštećenja organa, puknutih kostiju. Ukoliko dođe do toga, koriste se hranilice preko jednjaka (eng. *esophageal feeders*) koje omogućuju teladi da dobe potrebnu dozu kolostruma. Preporuča se da se telad tada odvoji od majke, ali ne duže od dva sata nakon porođaja. Takvo hranjenje može uzrokovati ozljede probavnog trakta pa je potrebno znanje i vještina. Drugi je faktor čistoća odnosno odsutnost bakterija u kolostrumu. Nažalost, na velikim farma visok postotak kolostruma ima veliko nivo bakterija (>100 000 cfu/mL). Bakterije u kolostrumu imaju negativan utjecaj na apsorpciju IgG u teladi jer se bakterije mogu vezati na njega u tankom crijevu ili mogu izravno blokirati uzimanje IgG od strane sluznice crijeva. Bakterije u kolostrumu također mogu bit patogene i uzrokovati bolesti, najčešće proljeve.

Postoji i nekoliko faktora koji su povezani s kravom koje utječu na kolostrum. Najbitnije je zdravlje krave. Izloženost patogenim bakterijama je presudno za zdravlje majke i kvalitetu kolostruma. Krave koje su izložene visokim količinama patogena vjerojatno će imati veće razine imunoglobulima. Što je krava starija to će biti veća mogućnost djelovanja patogena. Postoji i rizik u hranjenju teladi sirovim kolostrumom jer se izlaganje patogenima javlja prije nego što tele razvije svoj imuni sustav što može dovesti do smrti. Bakterije koje su opasne za tele i mogu dovesti do bolesti ili smrti u sirovom mlijeku su *Mycobacterium avium* spp.*, Paratuberculosis, Mycoplasma* spp.*, Escherichia coli,* i *Salmonella* spp.

Dalje, vakcinacija krava također ima utjecaj. Gravidna krava vakcinira se šest tjedana prije teljenja i dva tjedna nakon teljenja kako bi se stimulirala proizvodnja specifičnih tipova Ig. Oni se tada transportiraju u tele putem kolostruma i sprječavaju pojavu mnogih bolesti na koje su telad najosjetljiviji u prvim danima života. Oralno davanje Ig 10 sati nakon poroda je također jedan od pristupa za poboljšavanje imuniteta. Ovakvi pristupi imaju pozitivan učinak kod teladi koji su uzgojeni na istoj farmi gdje se nalazi i majka. Telad koja dolazi s druge farme ima manju šansu za stjecanje imuniteta.

Apsorbirani vitamin A, β-karoten i ksantofili koji se ne potroše i/ili uskladište u tjelesnim tkivima izlučuju se u mlijeku vezani uz mliječnu mast.

3.5.3. Mlijeko

Mlijeko je tekućina proizvedena putem mliječne žlijezde i luči se u određenom razdoblju života mliječnih životinja (laktacija). Kemijski sastav je promjenjiv, a na to utječu genotip, hranidba, stadij i redoslijed laktacije, zdravlje, razvijenost vimena, reprodukcija i temperatura zraka (Ivanković, 2014.)

Tablica 3. Kemijski sastav mlijeka (Ivanković, 2014)

Tvar	%
Voda	87,5
Mliječna mast	3,8-4,2
Proteini	3,3-3,5
Laktoza	4,6-4,8
Vitamini i minerali	0,75

Vitamin A se nalazi u mlijeku kao retinol i esteri retinila te kao provitamin vitamina A β-karoten. Punomasno mlijeko krava sadrži najviše retinola koji potječe iz sintetskog vitamina, smjesa i dodataka te od konverzije provitamin A karotenoida. U pravilu mlijeko sadrži najviše retinola pa β-karotena i najmanje ksantofila. U prosjeku u mlijeku je 40 µg retinola i 20 µg karotena/100g (Morrisey i Hill, 2009). Sadržaj karotenoida je povezan sa masnoćom mlijeka (Torsein i sur., 2018). Uloga karotenoida u mlijeku osim kao provitamin A je i davanje boje mliječnoj masti.

Na koncentraciju vitamina A i karotenoida u mlijeku značajno utječe sadržaj karotenoida i vitamina A u obroku krava. U pravilu mlijeko krava hranjenih tipičnim potpuno izmjiešanim obrokom sadrži (µg/dL) najviše (18-33) retinola, β-karotena (6-14) pa luteina (1,5 – 2,5) te najmanje zeaksantina (Stout i sur., 2018). Međutim, prema istim autorima zbog višeg sadržaja karotenoida u paši mlijeko krava na ispaši ih sadrži 1,5-2,0 puta više nego mlijeko krava hranjenih potpuno izmiješanim obrokom. Postoji visoki stupanj varijacije u koncentraciji vitamina A po godišnjim dobima; ljetno mlijeko sadrži više razine i vitamina A i β-karotena od zimskog mlijeka. Pasmina krave isto utječe na koncentraciju vitamina A u mlijeku. Pa tako mlijeko krava Švedsokog Holstein-a sadrži manje vitamin A i β-karotena od mlijeka krava Crvenog Švedskog Holstein-a (Torsein i sur., 2018).

Karotenoidi osim što su bitni kao hranjiva tvar važni su i za senzorna svojstva mlijeka. U državama gdje su se potrošači navikli na mlijeko krava hranjenih na paši traže mlijeko žute boje i specifičnog mirisa (slika 4). Karotenoidi boje masnoću mlijeka, a njhova antioksidacijska aktivnost sprečava kvarenje pa je i miris mlijeka drugačiji (Prache i sur., 2002). Mlijeko krava iz organske proizvodnje hranjenih bez dodataka vitamina A i konvencionalne proizvodnje sadrži slične koncentracije vitamina A i β-karotena osim u razdoblju oko teljenja kada je manja njihova koncentracija u organskoj proizvodnji što

rezultira većom brojem somatskih stanica u mlijeku i lošijim zdravljem teladi (Johannson i sur., 2014).

Slika 4. Mlijeko krava hranjeno ispašom (lijevo), prerađeno mlijeko iz trgovine (desno)
Izvor: http://keepingthefarm.blogspot.com/2012/03/novice-milkmaid-and-family-cow-my-first_05.html

Mlijeko sadrži specifične vezivne proteine za vitamin A koji poboljšavaju apsorpciju tako što štite i prenose vitamin do proteinskih receptora u crijevima, ili tako što imaju antibakterijska svojstva pa vitamini potrebni crijevnim bakterijama postaju nedostupni. Aktivnost ovih proteina se smanjuje ili potpuno uništava termičkom obradom (Wynn i Sheehy, 2013).

3.5.4. Mliječna zamjenica

Mliječne zamjenice su zamjene za mlijeko, a njihova fizička forma, tekstura, okus i sastav hranjivih tvari nalik su punomasnom mlijeku. Mliječna zamjenica za mladunce svih sisavaca pa tako i teladi trebala bi sadržavati 20-22% proteina i 10-25% masnoće (masnoća smanjuje učestalost proljeva, a masnoća životinjskog porijekla bolja je od masnoće biljnog porijekla) te 22 000 IJ/kg vitamina A (EFSA, 2013). Njemačke preporuke su da mliječna zamjenica sadrži najmanje 12 000 IJ/kg (LfL, 2017) dok kompanije proizvođači vitamina preporučuju znatno više doze pa tako DSM smatra da u mliječnoj zamjenici treba biti 20 000 do 32 000 IJ/kg (DSM, 2016).

Mliječne zamjenice obično se sastoje od obranog mlijeka u prahu (60-75%), biljnog ulja ili životinjske masti kao glavnog izvora energije (15-25%), mlaćenice (tekućina koja ja ostala nakon procesa dobivanja maslaca), proteina sirutke (5-10%), sojin lecitin – biljni emulgator koji se koristi u proizvodnji gotove hrane, prehrambeni aditiv (1-2%) i vitaminsko-mineralnog premiksa. Može se još u malim omjerima koristiti i glukoza, brašno žitarica, proteini koji nisu mliječnog podrijetla. Uzevši u obzir osnovni sastav mlijeka i njegov fizički

oblik, mliječna zamjenica bi trebala sadržavati sastojke koji daju proteine, masti, laktozu, minerale i vitamine te da se lako otapaju u vodi kako bi poticali hranjenje u fizičkom obliku sličnome mlijeku (Krishnamoorthy i Moran, 2011).

Kvalitetna mliječna zamjenica treba imati minimalno 50% mlijeka u prahu, energija mora biti slična punomasnom mlijeku i mora sadržavati minimalno 10% visokokvalitetne masti, preporuka je 15-20% masti (Moran, 2002), treba sadržavati adekvatne razine vitamina A, D i B_{12}, minimalna koncentracija visoko probavljivog proteina treba biti 22%, ne smije sadržavati vlakna i škrob, biti topljivi u toploj vodi, svijetle boje, bez stranih predmeta i materijala te ne smiju imati neugodan miris. Zapaljen miris indikator je oštećenja toplinom dok miris po boji, glini, benzinu upućuje na užeglost masti (Moran, 2002).

3.5.5. Starter

Starter je mješavina sastojaka namijenjena za prilagođavanje teladi na suhu hranu kako bi se ubrzao prijelaz iz ne preživača u preživača. Karakteristike dobre kvalitete startera čine te da mora sadržavati 18-20% proteina, ne smije sadržavati više od 8% sirovih vlakana ili 15% neutralnih detergent vlakana ili 6% kiselih detergent vlakana, mora imati minimalno 3% masnoće. Starteri trebaju sadržavati minimalno 40-60% žitarica i 30-40% pogača kao izvor proteina te 1-2% mineralno-vitaminskih premiksa. Također može sadržavati 10-15% nusproizvoda u proizvodnji žitarica te do 5% melase. Žitarice osiguravaju energiju, pogače proteine, nusproizvodi zasićuju, a melasa daje palatabilnost hrani. Starter mora biti mljeven ili peletiran. Ukoliko je fino mljeven, palatabilnost i unos opada.

Telad koja primi ograničenu količinu punomasnog mlijeka ili mliječne zamjenice te koja se odbija između 4-6 tjedna starosti, mora biti dopunjena s alternativnim izvorima krute hrane odnosno starterima. Normalno ponašanje teladi je da istražuju krutu hranu i dok se hrane tekućom hranom. Međutim, unos krute hrane ne povećava se značajno sve dok telad ne nauči jesti krutu hranu i dok se burag ne razvije u funkcionalni organ koji podržava normalnu fermentaciju. Kako bi se motivirala telad da jede startere, palatabilnost takve hrane mora biti prikladna pa se mora pružiti pažnja izboru sastojaka koji ulaze u startere. Grubo mljeveni starteri se čine palatabilnijima od fino mljevenih. Peletirani starteri su jednako palatabilni kao grubo mljeveni ako su peleti dovoljno mekani da se rastvore bez poteškoća (Krishnamoorthy i Moran, 2011).

Tipični starter za telad treba sadržavati 4 000 IJ/kg vitamina A. Prema preporukama potrebe vitamina A kod sisajuće teladi je 80 IJ/kg TM (NRC, 2001; INRA, 2018). Njemačke preporuke su da početna krmna smjesa za telad sadrži najmanje 8 000 IJ/kg (LfL, 2017). Početna krmna smjesa za telad do 4 mjeseca starosti trebala bi sadržavati 16 000 IJ vitamina A/kg (EFSA, 2013).

3.6. Vitamin A i karotenoidi u krmi

Voluminozna krma kao glavna hrana mliječnih krava sadrži oko 10 karotenoida od kojih su sljedeća četiri najzastupljeniji: lutein, β-karoten, zeaksantin i epilutein te u malim koncentracijama neoksantin, violaksantin i anteraksantin (Kalač, 2012). Voluminozna krmiva su glavni izvor karotenoida za mliječne krave i karakterizira ih jako variranje sadržaja uzrokovano razlikama između vrsta, stadija rasta, trajanja prosušivanja i načina konzerviranja te skladištenja (Agabriel i sur., 2007; Mogensen i sur., 2012).

Generalno, biljke s višim udjelom lista imaju više karotenoida od biljaka s višim udjelom stabljike (Kalač, 2012). Slame sadrže najmanje, slijede sijena te silaža kukuruza, a najviše imaju paša i zelena krma, trava i legeminoza. Naime, karotenoidi su jako osjetljiviji na oksidaciju tijekom prosušivanja koja ovisi od trajanja sušenja na polju i vremenskih uvjeta pa silaže i još više sijena sadrže nekoliko puta manje karotenoida od zelene krme. Međutim, pri dobrim uvjeta skladištenja, sadržaj karotena opada 6-7% mjesečno. Pa tako sijeno koje je starije od 6 mjeseci ostaje bez 50% sadržaja karotena (Crystalyx Brand Supplements, 2018).

3.7. Sintetski vitamin A spojevi

U proizvodnji mliječnih zamjenica i krmnih smjesa te farmaceutskih pripravaka koriste se spojevi vitamin A djelovanja koji imaju odobrenje Europske sigurnosne agencije za hranu (EFSA) koja ih ubraja u aditive i navedeni su u direktivi No. 1831/2003 i njenim kasnijim dopunama. Sintetske pripravke vitamina A karakterizira visoka i ujednačena koncentracija, dugotrajno održavanje (dodani antioksidans iste aktivnosti) i lako umješavanje u smjese ili druge pripravke.

Kako su sintetski spojevima vitamina A - retinil esteri jako osjetljivi na svjetlost, kisik (zrak), temperaturu i vlagu zaštićuju se od oksidacije na dva osnovna načina: tako da se stavljaju u tekuću uljastu formu - mikroemulziju ili su u obliku suhih krutih brašnastih granula.

Uljaste formulacije sadrže 250 000 do 2 500 000 IJ/g vitamina A emulziranog u 3-60% biljnog ulja i s dodatkom antioksidansa (etoksikvin, butihidroksitoluena (BHT), butilhidroksianisola (BHA), DL-α-tokoferola i askorbil palmitat, 1–25%). Mikroemulzije su veličine oko 1 µm i stabilne su na temperaturama 50–60 °C (EFSA, 2013). Suhe formulacije retinil acetata i palmitata se emulziraju u vodenoj otopini želatine, ugljikohidrata, glicerina te se sprej postupkom suše uz dodavanje aditiva za sprečavanje zgrudnjavanja (sipernat), nakon sušenja masa se prosijava, a 1 g sadrži 500 000 do 1 000 000 IJ vitamin A. Formulacije ostaju iste aktivnosti do 48 mjeseci ako se drže na 15 °C.

U premiksu su vitamini pomiješani sa solima mikroelemenata koje tijekom skladištenja od 6 mjeseci na 5-10 °C smanjuju biološku aktivnost vitamin A za 15-20% pa se za toliko povisuje njegova koncentracija u premiksu. Ukoliko su temperature skladištenja više od 15 °C tada se znatnije smanjuje biološka aktivnost vitamin A.

U krmne smjese se dodaju premiksi s vitaminom A i one se drže na temperaturama skladišta koje su često znatno više od poželjnih te je i viši gubitak vitamin A. Uz to, u smjese se dodaju premiksi koji su stajali neko vrijeme u skladištu te je zato trajnost smjesa ograničena na 3 mjeseca od datuma proizvodnje.

3.8. Veza između vitamina A u kolostrumu i plazmi

Oprečni su istraživački rezultati povezanosti davanja udarnih doza vitamin A i njegovog sadržaja u plazmi teladi. Tako istraživanje Kume i Toharmat (2000) dokazalo je da su koncentracije β-karotena pri teljenju varirale od 17,8 do 342,9 dok su koncentracije vitamina A varirale od 32,9 do 450,0 µg/dl u kolostrumu. U istom istraživanju razine β-karotena i vitamina A su porasle do šestog dana starosti. Kolostralni β-karoten pri teljenju pozitivno korelira s β-karotenom u plazmi kod teladi stare šest dana, ali nije bilo značajne korelacije između kolostralnog i plazmatskog vitamina A. Kumagai i sur.(2001) te Nonnecke i sur.(1999) su utvrdili da porast razine vitamina A u obroku gravidnih krava u predtelidbenom razdoblju povisuje njegovu koncentraciju u kolostrumu, ali ne i plazmi teladi.

Koncentracije β-karotena i vitamina A u kolostrumu i plazmi teladi jako ovise od forme vitamina A jer je hidroksilna forma apsortivnija od palmitata te ovisi o dozi vitamina A i trajanja davanja (Tomlinson i sur., 1975). Nadalje varirale su zbog nekoliko čimbenika poput individualnosti, pasmine, pariteta, hranidba prije teljenja, učestalost mastitisa te su koncentracije β-karotena i vitamina A u kolostrumu drastično opadale s vremenom nakon teljenja (Foley i Otterby, 1978; Kume i Tanabe, 1993b). Opažena je apsorpcija vitamina A kod teladi 81-95% tijekom prvog tjedna nakon teljenja dok je apsorpcija karotenoida bila tek 38-65% (Parrish i sur., 1953). Iako na široki raspon apsorpcije β-karotena i vitamina A u kolostrumu utječe nekoliko čimbenika, koncentracija β-karotena u kolostrumu direktno je utjecala na razinu β-karotena u plazmi teladi starih šest dana.

β-karoten iz kolostruma je bio primarni izvor za telad jer je koncentracija β-karotena u teladi pri porodu bila ekstremno niska dok je vitamin A kao izvor, uz kolostrum, dolazio i putem posteljice.

4. Materijali i metode

4.1. Pokus sa životinjama

Pokus je proveden na farmi visokomliječnih krava Kapelna (Slika 5 i 6) gdje je nasumično uzeto 12 teladi od čega sedam muške (9279, 9280, 9287, 9288, 9290, 9291, 9295) i pet ženske teladi (9278, 9284, 9286, 9289, 9299). Uginulo je tele broj 9287, 9289, 9290, 9291. Sva telad hranjena je na isti način – kolostrumom, prijelaznim mlijekom, mliječnom zamjenicom i starterom.

4.1.1. Uzorkovanje

Teladi je vađena krv iz jugularne vene u epruvete s heparinom (BD Vacutainer, UK) na dan rođenja, nakon sisanja kolostruma, 3.dana kada telad prelazi na prijelazno mlijeko te 21. i 42.dana kada je telad odbijena. Nakon uzimanja uzoraka krvi kod teladi, plazma je odvojena centrifugiranjem 15 min. pri 4000 okretaja (LC-320, Tehtnica, Slovenija). Plazma je odvojena u epruvete koje su skladištene na -20 °C do analize. Također su uzeti uzorci kolostruma, prijelaznog mlijeka i mliječne zamjenice u volumenu od 20 mL u plastične epruvete sa čepom. Starter smjese svakog teleta uzorkovane su u masama od 50 g u plastične vrećice su čuvane na +4 °C. Sve epruvete i vrećice propisano su označene te je preko markera dodatno nalijepljena ljepljiva traka kako ne bi došlo do brisanja prilikom pohrane.

Slika 2. Farma „Kapelna“
Izvor: Pamić, 2018

Slika 3. Farma „Kapelna“ – telad u zasebnim kavezima
Izvor: Pamić, 2018

4.2. Hranidba teladi u pokusu

Telad je hranjena kolostrumom dva dana nakon teljenja u količini 3-4 L/d. Trećeg dana starosti telad je hranjena mlijekom, a već 4. dana mliječnom zamjenicom uz dodatak startera i elektrolita. Kemijski sastav mliječne zamjenice i startera prikazan je u tablicama 4 i 5. Mliječna zamjenica je u prosjeku sadržavala 5,2 µg/g ST β-karotena i 6,0 µg/g ST retinola. Sadržaj β-karotena u retinola u starter smjesi je bio 16,4 i 14,6 µg/g ST 21. i 63,0 i 57,0 µg/g ST 42. dana pokusa. Telad je mliječnu zamjenicu dobivala dva puta na dan. U početku je količina popijene zamjenice iznosila oko 1,5 L ujutro i 2 L poslijepodne, a sva telad je u prosjeku 12. dana popila 6 L/d mliječne zamjenice. Sva telad dobivala je 2 L/d elektkrolita. Ukoliko je telad pokazivala znakove odbića uzimanja mliječne zamjenice koristili su se drenčeri. Značajniju količinu startera sva telad počela je uzimati 11. dana. Voda je bila stalno dostupna.

Tablica 4. JOOSTEN MILK ELITE – Potpuna mliječna zamjenica za telad (farma „Kapelna“, 2018)

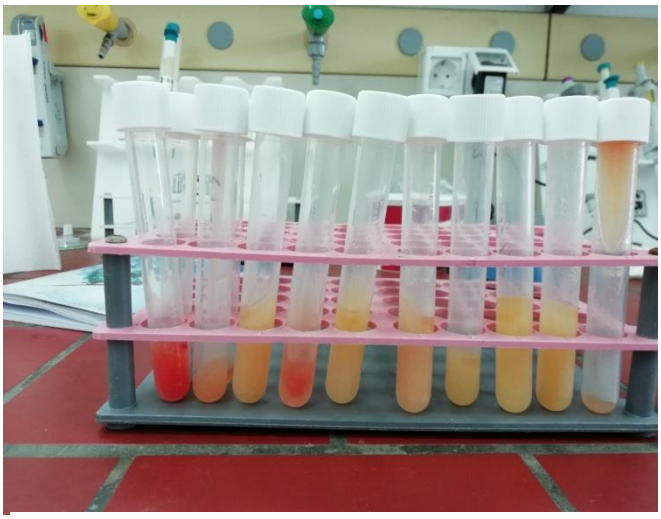
SASTAV PROIZVODA:	
Sirutka, biljno ulje (kokosovo, palmino), dekstroza	
ANALITIČKI SASTAV PROIZVODA:	%
Sirovi protein	22
Sirova mast	18
Sirovi pepeo	8
Kalcij	0,8
Fosfor	0,6
Natrij	0,6
NUTRITIVNI DODACI PO KG:	
Fe (Željezov sulfat monohidrat)	90 mg
Cu (Bakar sulfat monohidrat)	10 mg
Mn (Mangan sulfat monohidrat)	40 mg
Zn (Cink sulfat monohidrat)	40 mg
I (Kalcij jodid)	0,3 mg
Vitamin A	25 000 IJ
Vitamin D3	6 000 IJ
Vitamin E	150 IJ
PROBIOTICI:	
Bacillus Licheniforis	640 MCFU
Bacillus subtilis	640 MCFU

Tablica 5. GT-1 STARTER ZA TOV TELADI 21% SB (farma „Kapelna“, 2018)

Sirovina	Udio u smjesi (%)
Ječam	15
Mono kalcij fosfat	0,8
Premiks za telad	0,65
Pšenično krmno brašno	19,8
Soda bikarbona	0,25
Soja estrudirana	3,8
Sojina sačma 46%	22,44
Sol	0,36
Sredstvo za peletiranje	0,3
Suncokret sačma 33%	8
Tritikale	24
Vapnenac	1,6
Šećer	3

4.3. Ekstrakcija i kvantifikacija β-karotena i retinola u plazmi i hrani teladi

Analize su rađene u laboratoriju na Agronomskom fakultetu na Zavodu za hranidbu životinja. Ekstrakcija karotenoida iz plazme teladi provedena je prema metodi opisanoj u radu Lyan i sur. (2011). Uzorci plazme odmrznuti (Slika 7) nakon čega je u staklene epruvete za centrifugiranje otpipetiran alikvot od 2 mL plazme u duplikatu, čemu je dodano 2 mL etanola te 2 mL heksana. Smjesa je vorteksirana te su epruvete centrifugirane 5 min pri 4 000 rpm (Centric 322A, Tehtnica, Slovenija). Heksanski sloj je odvojen u tikvicu okruglog dna (Slika 8), a ekstrakcija je ponovljena tri puta. Sakupljeni heksanski ekstrakti su upareni na rotacionom uparivaču (Laborata 400 efficient, Heidolph, Njemačka; slika 9). Suhi ostatak otopljen u 300 µL otopine acetonitril:metanol:metilen klorid (45:20:35, v/v/v).

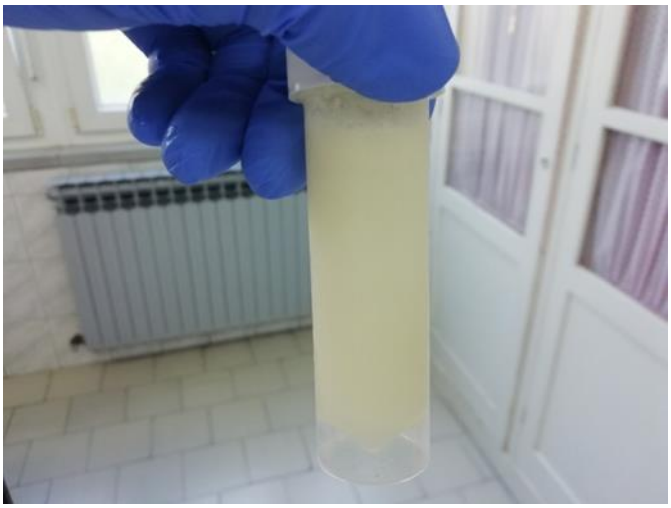


Slika 7. Uzorci plazme teladi
Izvor: Pamić, 2018

Slika 8. Tikvice s heksanskom frakcijom prilikom ekstrakcije
Izvor: Pamić, 2018

Slika 9. Uparavanje uzoraka nakon ekstrakcije
Izvor: Pamić, 2018

Ekstrakcija karotenoida iz kolostruma (slika 9), mlijeka i mliječne zamjenice provedena je prema metodi opisanoj u radu Hulshof i sur. (2006) i Noziere i sur. (2006b). Uzorci su odmrznuti nakon čega je 2 mL alikvota u duplikatu otpipetirano u staklene epruvete za centrifugiranje. U svaku epruvetu je zatim otpipetirano 1 mL destilirane vode, 2 mL etanola i 2 mL heksana. Uzorci su vorteksirani, a zatim centrifugirani 10 min pri 4000 okretaja. Gornji dio organske faze prikupljen je kapaljkom i odvojen u plastičnu epruvetu od 50 mL, a postupak je ponovljen do obezbojenja (slika 10). U organsku fazu otpipetirano je zatim 2 mL 15% otopine NaOH u etanolu te je smjesa ostavljena na saponifikaciji preko noći. Organska faza isprana je zatim vodom; u svaku epruvetu dodano je 6mL vode, smjesa je vorteksirana i centrifugirana 5 min pri 4000 rpm, nakon centrifugiranja odvojen je vodeni dio faze te je postupak ponovljen tri puta kako bi se iz ekstrakta isprala lužina. Posljednjeg puta ispiranja vodom, heksanski sloj je odvojen u tikvice okruglog dna i uparen na rotacionom uparivaču (Laborata 400 efficient, Heidolph, Njemačka). Suhi ostatak otopljen u 300 µL otopine acetonitril:metanol:metilen klorid (45:20:35, v/v/v).

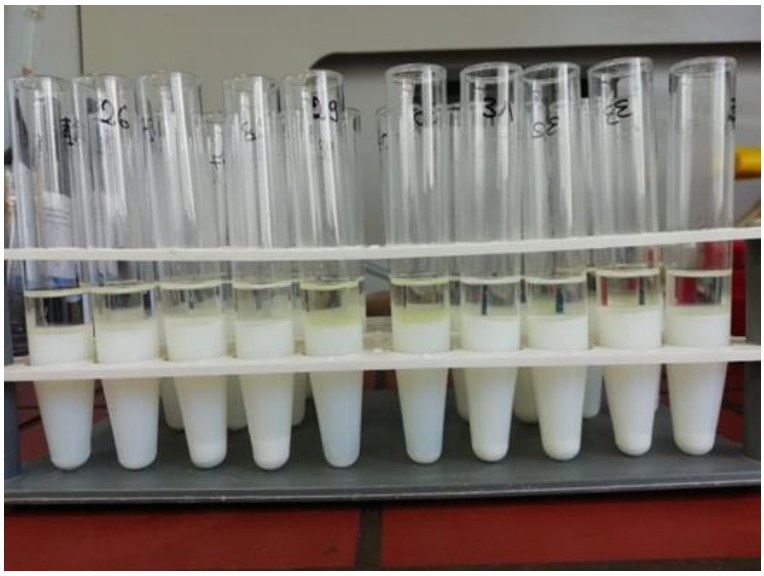


Slika 10. Uzorak kolostruma

Izvor: Pamić, 2018

Ekstrakcija retinola i karotenoida iz uzoraka startera provedena je prema metodi opisanoj u radu Pickworth i sur. (2012). Uzorci startera su neposredno prije analize samljeveni na mlinu sa sitom 1 mm (Cyclotec, Tecator, Švedska). U staklene epruvete za centrifugiranje izvagan je 1 g uzorka u duplikatu. U svaku je epruvetu otpipetirano 3 mL smjese otapala heksan/etanol (1:1; slika 10). Nakon vorteksiranja, uzorci su centrifugirani 10 min pri 4 000 okretaja te je organska faza odvojena u plastičnu epruvetu od 50 mL. Postupak ekstrakcije je ponovljen još tri puta u tubu, a spojenim je ekstraktima zatim dodana 10%-tna vodena otopina NaCl. Epruvete su vorteksirane i centrifugirane 5 min pri 4 000 rpm nakon čega je heksanski sloj odvojen u nove plastične epruvete. Dodatkom 15%-tne otopine NaOH u etanolu u svaku epruvetu proveden je postupak saponifikacije preko noći i ispiranja

ekstrakta vodom po već opisanom postupku. Posljednjeg puta ispiranja vodom, heksanski sloj je odvojen u tikvice okruglog dna i uparen na rotacionom uparivaču (Laborata 400 efficient, Heidolph, Njemačka). Suhi ostatak otopljen u 300 µL otopine acetonitril:metanol:metilen klorid (45:20:35, v/v/v).



Slika 11. Ekstrakcija retinola i karotenoida iz uzoraka kolostruma heksanom

Izvor: Pamić, 2018

Slika 12. Uzorak nakon centrifugiranja- starter

Izvor: Pamić, 2018

Karotenoidni spojevi i retinol odvojeni su i kvantitativno određeni tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatogryphy, HPLC*, slika 13) uz UV/Vis spekrofotometar. Sistem kolona bio je sastavljen od serijski spojenih Vydac 201TP54 (5 µm; 4,6 x 150 mm; Grace Davison Discovery Sciences, SAD) i Zorbax RX-C18 (5 µm; 4,6 x 150 mm; Agilent Technologies, SAD) C18 kolona obrnutih faza. Kolone su bile zaštićene Supelguard Discovery (5 µm; 4 x 20 mm; Supelco, SAD) C18 zaštitnom kolonom.

HPLC sustav SpectraSystem (Thermo Separation Products, Inc., SAD) sastojao se od kvaterne gradijent pumpe (P4000), sustava za otplinjavanje (SCM 1000), automatskog sustava za injektiranje uzorka (AS3000), grijača kolone te UV/Vis (UV2000) i fluorescencijskog (FL3000) detektora (slika 11). Podaci su sakupljeni i obrađeni ChromQuest 5.0 softwareom (Thermo Fisher Scientific, SAD).

Pokretna faza sastojala se od smjese otapala acetonitril:metanol:metilen klorid (75:20:5, v/v/v) i sadržavala je 0,05% trietil-amina (TEA) i 0,1% BHT. Protok mobilne faze bio je namješten na 1,8 mL/min pri sobnoj temperaturi. Volumen injektiranja otopina uzoraka bio je 30 µL. Karotenoidi su detektirani pri 450 nm, a retinol pri 325 nm.

Za identifikaciju i kvantitativno određivanje retinola i β-karotena pripremljene su ishodne otopine (Sigma Aldrich, Njemačka). Otopine standarda pripremljene su u apsolutnom etanolu, a stvarne koncentracije ishodnih otopina određene su spektrofotometrijski korištenjem spektralnih apsorpcijskih koeficijenata spojeva. Za identifikaciju ispitivanih spojeva pripremljene su radne otopine uzimanjem alikvota ishodne otopine, uparivanjem otapala te otapanjem ostatka u 1 mL otopine acetonitril:metanol:metilen klorid (45:20:35, v/v/v). Pojedinačni standardi propušteni su kroz HPLC te je zabilježeno retencijsko vrijeme na temelju kojega je identificiran određeni spoj. Različitim alikvotima ishodnih otopina pripremljeno je pet otopina različitih koncentracija pojedinačnih standarda za pet točaka baždarnog pravca. Spojeni alikvoti retinola i β-karotena upareni su na rotacionom uparivaču i otopljeni u 1 mL otopine acetonitril:metanol:metilen klorid (45:20:35, v/v/v).

Slika 13. HPLC sustav SpectraSystem (Thermo Separation Products, Inc., SAD)
Izvor: Kljak, 2018

4.4. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka provedena je pomoću statističkog paketa SAS 9.4 (Statistical Analysis System, 2015.). Rezultati istraživanja su obrađeni kao ponovljena mjerenja korištenjem MIXED procedure sa SP(POW) kao strukture kovarijance za vremenske intervale. Srednje vrijednosti i standardne greške su određene korištenjem LSMEANS naredbe dok su razlike srednjih vrijednosti određene korištenjem PDIFF naredbe. Povezanost sadržaja retinola i β-karotena u hrani i plazmi ispitana je korištenjem CORR procedure, a zatim i ortogonalnim kontrastima. Statistička signifikantnost bila je postignuta ako je $P \leq 0,05$.

5. Rezultati i rasprava

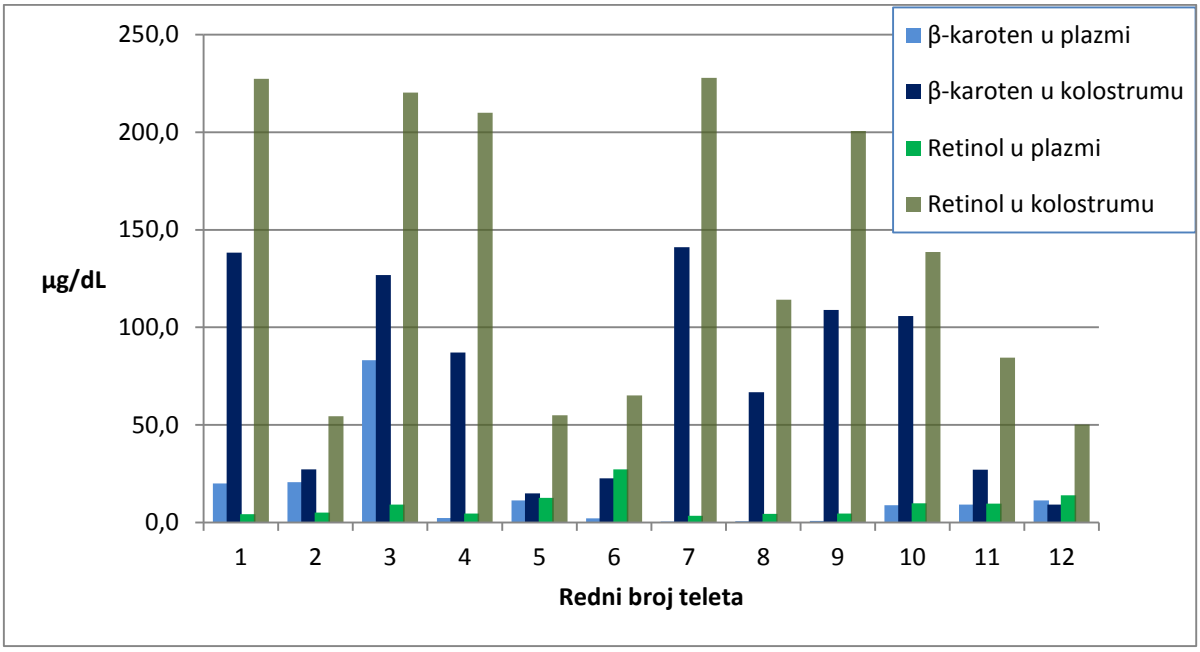
5.1. β-karoten i retinol u plazmi i kolostrumu teladi

Kao što je vidljivo iz grafikona 1 i tablice priloga 1, novorođena telad je nakon popijenog kolostruma imala raspon koncentracije β-karotena 0,5-83,2 µg/dL u plazmi gdje je najnižu koncentraciju imalo tele broj 9288, a najvišu 9280. U prosjeku koncentracija β-karotena iznosila je 14,3 µg/dL, a standardna devijacija je iznosila 22,8. Utvrđene vrijednosti i njihovo veliko variranje se nalaze u rasponu vrijednosti koji su dobili Kume i Toharmat (2000).

Koncentracija β-karotena u kolostrumu je u prosjeku iznosio 73 µg/dL dok je njegov raspon koncentracije varirao od 9,2 do 141,1 µg/dL s odstupanjem od 50,9. Majka teleta 9299 imala je najnižu koncentraciu β-karotena u kolostrumu i ona je iznosila 9,2 µg/dL, dok je majka teleta 9288 imala najvišu koncentraciju β-karotena u kolostrumu i iznosila je 141,1 µg/dL. Kod autora Kum i Toharmat (2000) koncentracija je varirala između 17,8-342,9 µg/dL. Kaewlamun i sur. (2011) uspoređivali su rezultate koncentracije β-karotena u kolostrumu između kontrolne grupe i grupe u kojoj je osam tjedana prije teljenja u hranu gravidnih krava dodavan 1 g/d β-karotena. Dodavanjem β-karotena u hranu krava povišena je koncentracija u kolostrumu za 115% odnosno sa 144 µg/dL na 310 µg/dL, no u krvi teladi nije zamijećen porast u koncentraciji β-karotena.

Koncentracija retinola u plazmi teladi prvog dana nakon teljenja varirala je u rasponu 3,4-27,2 µg/dL, a u prosjeku je iznosila 9 µg/dL. Najnižu koncentraciju retinola imalo je tele broj 9288 – tele i s najnižom koncentracijom β-karotena, a najvišu tele 9287. Standardna devijacija iznosila je 6,7 µg/dL. Dobivene vrijednosti slažu se sa podacima autora Puvogel i sur. (2000) gdje je vrijednost koncentracije retinola prvog dana nakon teljenja također bila 9 µg/dL. S druge strane, vrijednosti dobivene u ovom istraživanju su bile više od 3 µg/dL koliko je u prosjeku ostvarila telad u radu Nonnecke i sur. (1999).

Retinol se u kolostrumu kretao između 50,1-227,9 µg/dL, a njegova prosječna koncentracija iznosila je 137,3 µg/dL. Majka teleta 9299 imala je najnižu koncentraciju retinola u kolostrumu i iznosila je 50,1 µg/dL, dok je majka teleta 9288 imala najvišu koncentraciju retinola u kolostrumu te je iznosila 227,9 µg/dL. Kolostrum u radu Kume i Toharmat (2000) je imao veći raspon vrijednosti - 32,9-450,0 µg/dL. S druge strane, dobivene koncentracije retinola u plazmi teladi hranjene kolostrumom bile su veće nego u istraživanju Debier i sur. (2005). Niske koncentracije retinola, < 4 µg/dL, pokazatelj su niske opskrbljenosti vitaminom A i veće opasnosti od pobolijevanja. Telad pod brojem 9284, 9287, 9288, 9289 i 9290 imali su kritično nisku koncentraciju β-karotena što je moguće dovelo do uginuća svih telića osim 9284 i 9288 tijekom promatranog razdoblja.



Grafikon 1. Koncentracije β-karotena i retinola u plazmi i kolostrumu kod teladi prvog dana nakon teljenja

5.2. β-karoten i retinol u plazmi teladi trećeg dana starosti i u prijelaznom mlijeku

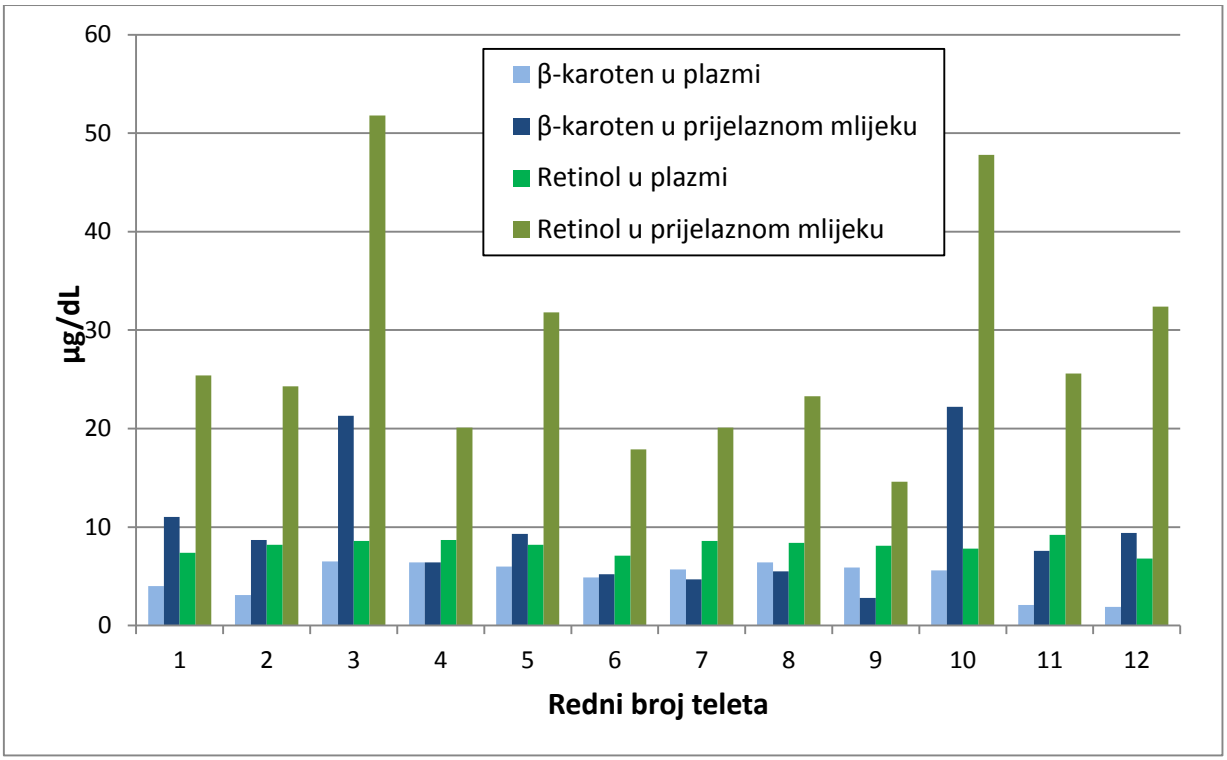
Iz podataka vidljivih u grafikonu 2 i tablici priloga 2, raspon β-karotena u plazmi teladi trećeg dana nakon teljenja iznosio je od 1,9 do 6,5 µg/dL. Prosječna vrijednost iznosila je 4,9 µg/dL. Najvišu koncentraciju imalo je tele 9280, koje je također imalo i najvišu koncentraciju β-karotena prvog dana, a najnižu tele broj 9299. Standardna devijacija iznosila je 1,67 µg/dL.

β-karoten u prijelaznom mlijeku manje je bio varijabilan nego u kolostrumu i bio je u rasponu 2,8 – 22,2 µg/dL. Prosječna vrijednost iznosila je 9,5 µg/dL dok je standardna devijacija iznosila 6,1 µg/dL. Mlijeko krava hranjenih obrocima trebalo bi sadržavati između 6-14 µg/dL karotena (Stout i sur., 2018) te su vrijednosti dobivene u ovom istraživanju u pravilu u navedenom ili više od navedenog raspona.

Trećeg dana nakon teljenja retinol u plazmi teladi kretao se od 6,8 do 9,2 µg/dL. Prosječna vrijednost iznosila je 7,3 µg/dL a standardna devijacija 0,7 µg/dL. Najvišu vrijednost imalo je tele 9295, a najnižu 9299. Prosječne vrijednosti u ostalim istraživanjima iznosile su 11 µg/dL (Puvogel i sur.,2000) i 5 µg/dL (Nonnecke i sur.,1999) što je slično vrijednostima dobivenim u ovom istraživanju. Izuzetne rezultate dobili su Bouda i sur. (1979) gdje je koncentracija retinola iznosila 17,4 µg/dL.

Koncentracija retinola u prijelaznom mlijeku kretala se između 14,6 -51,8 µg/dL, a u prosjeku je iznosila 27,9 µg/dL dok je standardna devijacija iznosila 11,4 µg/dL. Stout i sur.

(2018) navode da je tipična koncentracija retinola u mlijeku krava hranjenim izmiješanim obrocima između 13-33 µg/dL što je slično rasponu dobivenom u ovom istraživanju. Vrijednosti su mnogo više uspoređujući ih s koncentracijom retinola u istraživanju Gessner i sur. (2015) gdje je ona kod teladi starih tjedan dana iznosila 18,7 µg/dL.

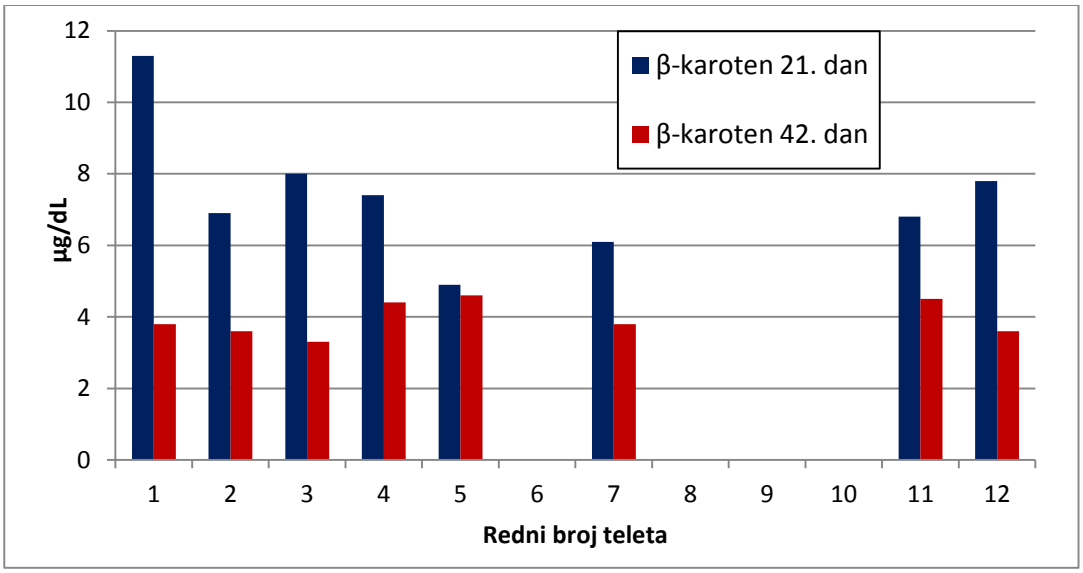


Grafikon 2. Koncentracija β-karotena i retinola u plazmi teladi i prijelaznom mlijeku trećeg dana nakon teljenja

11.3. β-karoten i retinol u plazmi teladi starih 21 i 42 dana

U ovoj fazi istraživanja, telad s brojem 9287, 9289, 9290, 9291 je uginula što je bilo i očekivano gledajući vrijednosti koncentracije retinola u plazmi prvog dana (tablica priloga 3). Telad je 21. dana imala višu koncentraciju β-karotena i retinola u plazmi u odnosu na prvi i treći dan starosti što ukazuje na viši udjel tih spojeva u mliječnoj zamjenici. Raspon β-karotena u plazmi se kretao od 4,9 do 11,3 µg/dL gdje je tele 9286 imalo najmanju koncentraciju, a tele 9278 najvišu koncentraciju β-karotena (grafikon 3). Srednja vrijednost koncentracije β-karotena u plazi teladi iznosila je 7,4 µ/dL a standardna devijacija 1,66 µg/dL. Ovi su rezultati niži u odnosu na vrijednosti u radu Nonnecke i sur. (1999), čija je srednja vrijednost iznosila 8 µg/dL.

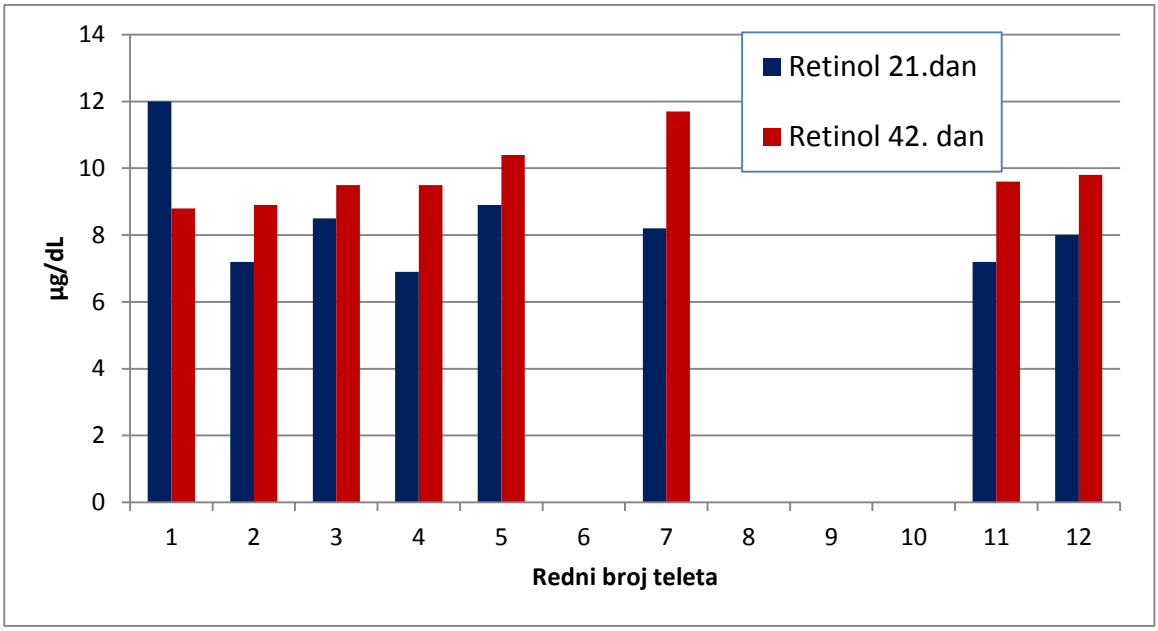
Telad je 42. dana starosti imala niske vrijednosti β-karotena i one su se kretale od 3,3 do 4,6 µg/dL. Najnižu vrijednost imalo je tele 9280, a najvišu 9286. Prosječna vrijednost je iznosila 3,9 µg/dL a standardna devijacija 0,48 µg/dL. Vidljivo je da se koncentracija β-karotena smanjuje s promjenom hrane te ovi rezultati prate rezultate Nonnecke i sur. (1999) gdje je i njihova koncentracija karotena niža 42. dana u odnosu na 21. dan starosti teladi a iznosila 6 je µg/dL.



Grafikon 3. Koncentracija β-karotena u plazmi teladi 21. i 42. dana starosti

Koncentracija retinola u plazmi (grafikon 4) teladi stare 21 dan kretala se od 6,9 do 12,0 µg/dL. Najvišu vrijednost imalo je tele 9278, a najnižu 9284. Prosječna vrijednost iznosila 8,4 µg/dL a standardno odstupanje 1,64 µg/dL. Ove vrijednosti su niže u odnosu na druga istraživanja; telad u radu Nonnecke i sur. (1999) i Puvogel i sur. (2000) su imale višu koncentraciju koja u prosjeku iznosi u oba slučaja 10 µg/dL kao i telad u radu Boude i sur. (1979) kojoj je prosječna vrijednost koncentracije retinola u plazmi iznosila 19,3 µg/dL.

Koncentracija retinola se u plazmi teladi 42. dana povisila u odnosu na 21. dan starosti te u prosjeku iznosi 9,8 µg/dL, a raspon se kretao od 8,8 do 11,7 µg/dL. Tele broj 9278 imalo je najnižu vrijednost, dok je tele 9288 imalo najvišu vrijednost. Ovaj rezultat nije se slagao sa rezultatom Nonneckog i sur. (1999) gdje je koncentracija retinola u plazmi teladi 42. dana bila niža nego 21. dana i iznosila je 9 µg/dL. Kao što prati i prethodne njihove podatke, Bouda i sur. (1979) dobili su koncentraciju retinola 23,7 µg/dL što je i više nego dva puta više u odnosu na telad u ovom istraživanju.



Grafikon 4. Koncentracija retinola u plazmi teladi 21. i 42. dana starosti

5.4. Povezanost koncentracije retinola i β-karotena u hrani i plazmi teladi

Utvrđena je pozitivna korelacija (P ≤ 0,01) između koncentracije β-karotena u hrani i u plazmi, te negativna korelacija koncentracije β-karotena u hrani s koncentracijom retinola u plazmi (tablica 7). Povećanje unosa β-karotena kod krava putem obroka utječe na koncentraciju β-karotena u kolostrumu i mlijeku, a samim time i telad dobiva veće količine istog, odnosno utječe na koncentraciju β-karotena u plazmi (Wise i sur., 1946; Kumagai i sur., 2001; Puvogel i sur., 2005). Negativna korelacija između β-karotena u hrani i retinola u plazmi je takva zbog limitirane mogućnosti teladi za apsorpciju β-karotena u crijevima (Yonekura i Nagao, 2007) ili konverzije β-karotena u retinol (Hammell i sur., 1998; Nonnecke i sur., 1999, 2000).

Tablica 7. Koeficijenti korelacije koncentracija β-karotena i retinola u hrani i plazmi teladi

	β-karoten u hrani	**Retinol u hrani**
β-karoten u plazmi	0,39**	0,39**
Retinol u plazmi	-0,32*	-0,30*

Značajno za navedenu P vrijednost: * P ≤0,05; ** P ≤ 0,01

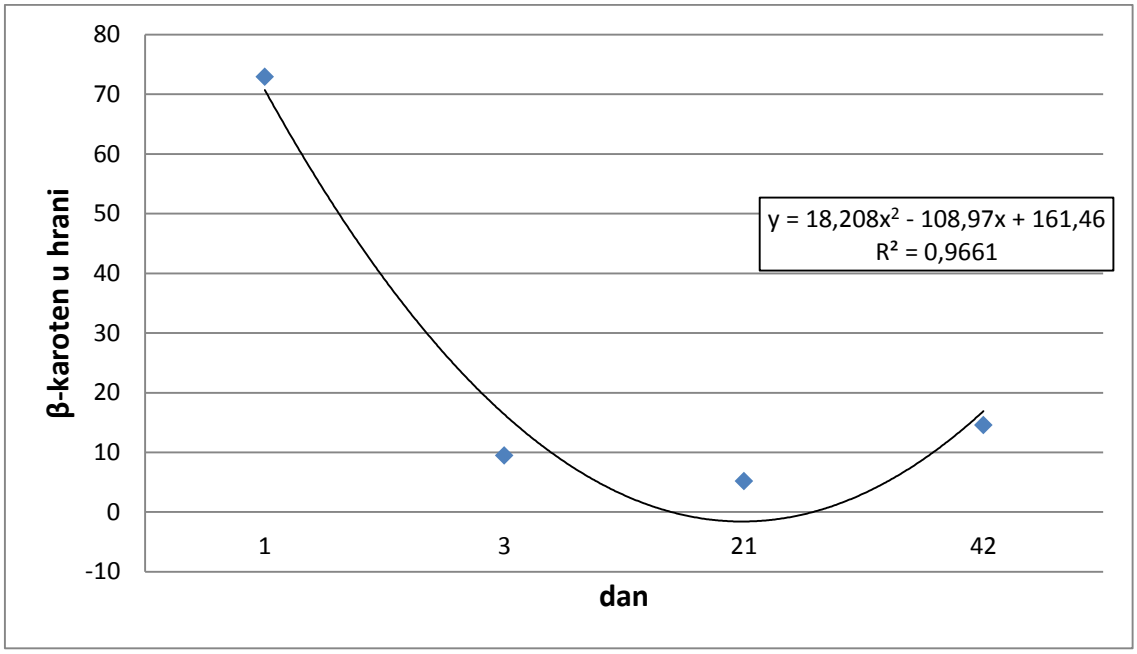
Koncentracija retinola u hrani pozitivno je korelirao s koncentracijom β-karotena u plazmi (P ≤ 0,01), dok je s povećanjem koncentracije retinola u hrani opadala koncentracija retinola u plazmi. Razlog tome je moguće dodavanje vitamina A u obrok, a ono smanjuje njegov sadržaj u plazmi teladi; koncentracije vitamina A u hrani i plazmi ovise o formi - alkohol je puno apsorptivniji od palmitata kako navode Tomlinson i sur. (1975). Također, suplementacija krava vitaminom A u suhostaju povećala je koncentraciju vitamina A u plazmi i kolostrumu krava, ali je koncentracija retinola kod teladi bila nepromijenjena te tako utjecaj dodanog vitamina A u obroku krava tijekom suhostaja na status vitamina A teladi nije jasan (Kumagai i sur., 2001).

5.5. Promjena koncentracije retinola i β-karotena u plazmi i hrani sa starošću teladi

Dan uzorkovanja krvi tj. starosti teladi nije utjecao na koncentraciju retinola i β-karotena u plazmi te ne prati niti jedan ispitivani model (tablica 8). S druge strane, značajan je utjecaj dana na koncentracije β-karotena i retinola u hrani. Utjecaj na β-karoten u hrani prati linearni i kvadratni model dok utjecaj na retinol u hrani prati linearni, kvadratni i kubni model.

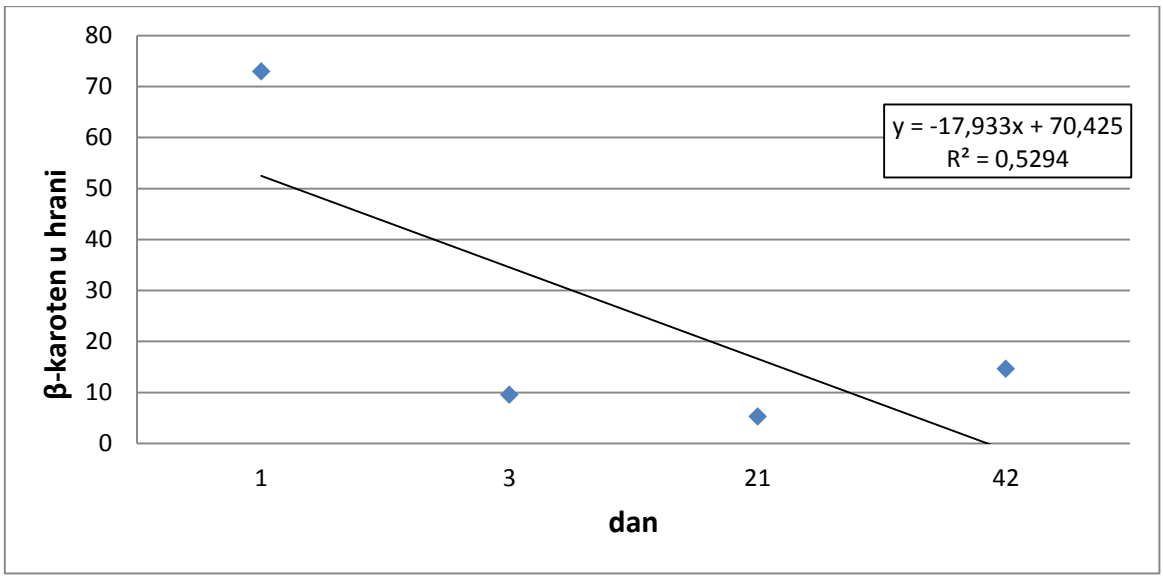
Tablica 8. Ortogonalni kontrasti povezanosti dana uzimanja uzoraka krvi i koncentracije i β-karoten i retinola u plazmi i hrani teladi

	Utjecaj dana uzorkovanja krvi	Kontrasti, P		
		Linearni	**Kvadratni**	**Kubni**
β-karoten u plazmi	0,3312	0,0845	0,5180	0,3698
Retinol u plazmi	0,8091	0,6285	0,3992	0,8998
β-karoten u hrani	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,1862
Retinol u hrani	<0,0001	<0,0001	0,0010	0,0063

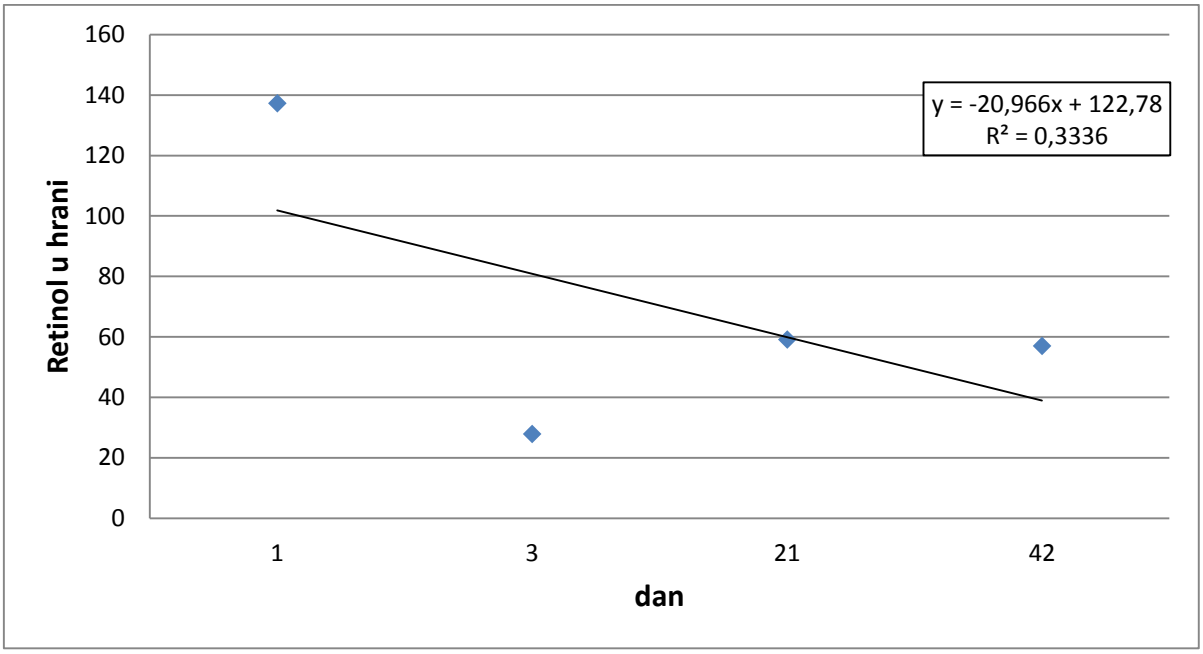


Grafikon 5. Procijenjeni kvadratni efekt utjecaja dana uzimanja uzorka hrane s prosječnom vrijednosti koncentracije β-karotena u hrani

Na temelju tablice konstruirani su linearni i kvadratni pravci ovisnosti dana uzimanja uzoraka hrane i koncentracije β-karotena u hrani (grafikoni 5 i 6). S obzirom na koeficijente determinacije, kvadratna ovisnost (R^2=96,6%) preciznije opisuje zapažene promjene s danom u odnosu na linearnu (R^2=52,9%).

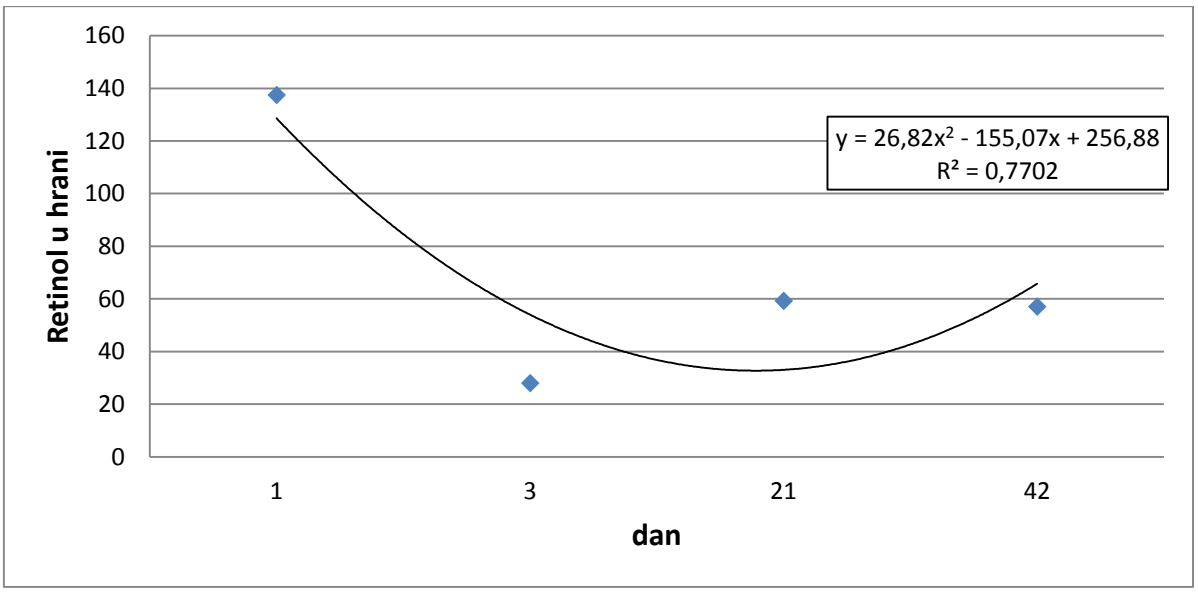


Grafikon 6. Procijenjeni linearni efekt utjecaja dana uzimanja uzoraka hrane s prosječnom vrijednosti koncentracije β-karotena u hrani

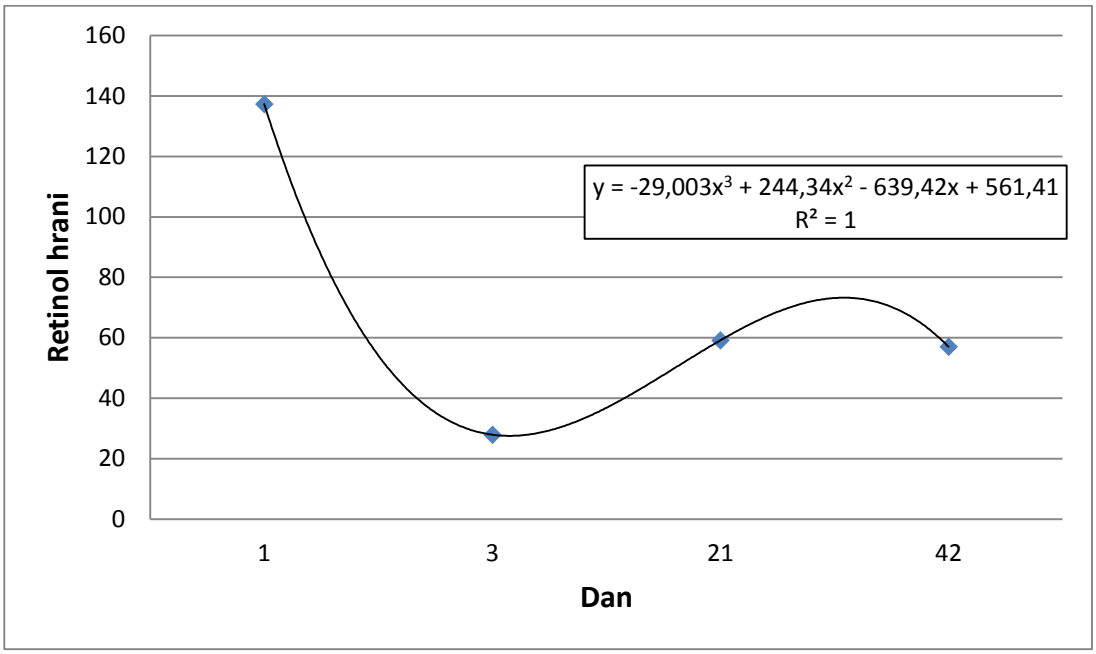


Grafikon 7. Procijenjeni linearni efekt utjecaja dana uzimanja uzoraka hrane s prosječnom vrijednosti koncentracije retinola u hrani

Na temelju tablice konstruirani su linearni, kvadratni i kubni pravci ovisnosti dana uzimanja uzorka i koncentracije retinola u hrani (grafikoni 7-9). S obzirom na koeficijente determinacije, kubna ovisnost (R^2=1%) preciznije opisuje zapažene promjene s danom u odnosu na linearnu (R^2= 33,3%) i kvadratnu (R^2=77%).



Grafikon 8. Procijenjeni kvadratni efekt utjecaja dana uzimanja uzoraka hrane s prosječnom vrijednosti koncentracije retinola u hrani



Grafikon 9. Procijenjeni kubni efekt utjecaja dana uzimanja uzoraka hrane s prosječnom vrijednosti koncentracije retinola u hrani

6. Zaključak

U provedenom istraživanju praćene su koncentracije β-karotena i retinola u plazmi teleta 1., 3., 21. i 42.dana starosti na 12 teladi te u hrani odnosno, kolostrumu, prijelaznom mlijeku, mliječnoj zamjenici i starteru.

Na temelju rezultata može se zaključiti sljedeće:

- Kolostrum sadržava najvišu koncentraciju β-karotena i retinola u odnosu na mlijeko i mliječnu zamjenicu.
- Telad koja je imala niže koncentracije β-karotena i retinola u plazmi prvog dana uginula je ili je imala zaostali rast i razvoj tijekom promatranog razdoblja od 42 dana.
- Dan uzorkovanja seruma nije utjecao na koncentracije β-karotena i retinola u plazmi teladi, ali je koncentracija bila povezana s vrstom hrane koju je tele unosilo.
- Povećani unos β-karotena u obroku krave povećao je koncentraciju u kolostrumu, a samim time i plazmi teladi.

7. Literatura

1. Agabriel C., Cornu A., Journal C., Sibra C., Grolier P., Martin B. (2007). Tanker milk variability according to farm feeding practices: Vitamins A and E, carotenoids, color, and terpenoids. Journal Dairy Science. 90:4884–4896.
2. Akar Y., Gazioglu A. (2006). Relationship between vitamin A and β-carotene levels during the postpartum period and fertility parameters in cows with and without retained placenta. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy. 50:93-96.
3. Baldwin T.J., Rood K.A., Kelly E.J., Hall J.O. (2012). Dermatopathy in juvenile Angus cattle due to vitamin A deficiency. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2012;24:763–6.
4. Blomhoff R., Blomhoff H.K. (2006). Overview of retinoid metabolism and function. Journal of Neurobiolog. 66:606–630.
5. Blomhof R., Green M.H., Berg T., Norum R.E. (1990). Transport and storage of vitamin A. Science. 250:399–404.
6. Bouda, J., Jagoš, P., Dvorak, VL., Hamšik, V., (1979). Vitamin A and carotene metabolism in cows and their calves fed from bucket. Acta Veterinaria. 1980: 45-52.
7. Chew B.P., Johnson L.A. (1985). Effects of supplemental vitamin A and β-carotene on mastitis in dairy cows. Journal Dairy Science. 68(suppl.1): 191.
8. Combs G.F., McClung J.P. (2017). The Vitamins, fundamental aspects in nutrition and health, 3th edition. Elsevier.
9. Crystalyx Brand Supplements (2018). The role of vitamin A in ruminant nutrition, <https://www.drovers.com/article/role-vitamin-ruminant-nutrition>. Pristupljeno 19. kolovoza 2018.
10. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (2007). Nutrient requirements of domesticated ruminants. CSIRO Publishing, Collingwood.
11. Cuttriss A. J., Cazzonelli C. I., Wurtze, E. T., Pogso, B. J. (2011). Carotenoids. U: Biosynthesis of Vitamins in Plants. 1-36. Academic Press, U.K.
12. Dahlquist S.P., Chew B.P. (1985). Effect of vitamin A and β-carotene oon mastitis in dairy cows during the early dry period. Journal Dairy Science. 68 (Suppl.1): 191.
13. Debier C., Larondelle, Y. (2005). Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. British Journal of Nutrition. 93:153-174.
14. Debier C., Pottier J., Goffe C., Larondelle Y. (2005). Present knowledge and unexpected behaviours of vitamins A and E in colostrum and milk. Livestock Production Science. 98:135-147.
15. Debelo H., Novotny J.A., Ferruzzi M.G. (2017). Vitamin A. Advances in Nutrition. 8:992–994.
16. DSM (2016). Vitamin Supplementation Guidelines for Animal Nutrition, www.dsm.com/markets/anh/en_US/products/products-vitamins/products-vitamins-ovn/ruminants. Pristupljeno 19. Kolovoza 2018.

17. European Food Safety Authority (2013). Scientific Opinion on the safety and efficacy of vitamin A (retinyl acetate, retinyl palmitate and retinyl propionate) as a feed additive for all animal. EFSA Journal. 11(1):3037.
18. Eicher S.D., Morrill J.L., Blecha F., Chitko-Mcknown C.G., Anderson N.V., Higgins J.J. (1994). Leukocyte functions of young dairy calves fed milk replacers supplemented with vitamins A and E. Journal Dairy Science. 77, 1399–1407.
19. Engelking L. (2014). Textbook of Veterinary Physiological Chemistry, 3rd Edition. Academic Press, USA.
20. Foley J.A., Otterby D.E. (1978). Availability, storage, treatment,composition, and feeding value of surplus colostrum. Journal Dairy Science. 61:1033-1060.
21. Franklin S.T., Soremson C.E., Hammell D.C. (1998). Influence of vitamin A supplementation in milk on growth, health, concentrations of vitamins in plasma, and immune parameters of calves. Journal Dairy Science. 81:2623–2632.
22. Gallina A.M., Helmboldt C.F., Frier H.I., Nielsen S.W., Eaton H.D. (1970). Bone growth in the hypovitaminotic A calf. Journal Nutrition. 100:129–41.
23. Gessner D.K., Most E., Schlegel G., Kupczyk K., Schwarz F.J., Eder K. (2015). Concentrations of retinol and tocopherols in the milk of cows supplemented with conjugated linoleic acid. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 1039-1046.
24. Grbeša D. (2017). Interna skripta za studente „Krmiva za krave“. Agronomski fakultet, Zagreb.
25. Hammell D.C., Franklin T., Nonnecke B.J. (2000). Use of the relative dose response (RDR) assay to determine vitamin A status of calves at cirth and four weeks of age. Journal Dairy Science 83:1256–1263.
26. Hammell D. C., Franklin S. T., Nonnecke B. J. (1998). Use of the relative dose response (RDR) assay to deter-mine vitamin A status of calves at birth and four weeks of age.Journal of Dairy Science. 83: 1256–1263.
27. Horst R.L., Nonnecke B.J., Waters W.R., Dubeski P., Harp J.A. (1999). Modulation of Fat-Soluble Vitamin Concentrations and Blood Mononuclear Leukocyte Populations in Milk Replacer-Fed Calves by Dietary Vitamin A and β-Carotene. Journal Dairy Science. 82:2632-2641.
28. Harrison E. H. (2005). Mechanism of digestion and absorption of dietary vitamin A. Annual Review of Nutrition. 25:87-103.
29. Hulshof P.J.M, Van Roekel-Jansen T., Van de Bovenkamp P., West C.E. (2006). Variation in retinol and carotenoid content of milk and milk products in the Netherland. Journal of Food Composition and Analysis. 19:67-75.
30. Immig, I. (2015). Using feed additives to improve milk production and dairy farm efficiency. International Dairy Topics.13(5): 31-35.
31. Irie T., Sugimoto T., Ueki N., Senoo H., Seki T. (2010). Retinoid storage in the egg of reptiles and birds. Comparative Biochemistry & Physiology. 157:113–118.

32. Ivanković A. (2014). Interna skripta za studente „Tehnologija proizvodnje mlijeka“, Agronomski fakultet, Zagreb.
33. Johansson B., Persson W.K., Jensen S.K., Lindgvist H., Nadeau E. (2014). Status of vitamins E and A and β-carotene and health in organic dairy cows fed a diet without synthetic vitamins. Journal dairy science. 97:1682-1692.
34. Kaewlamun W., Okouyi M., Humblot P., Remy D., Techakumphu M., Duvaux-Ponter C., Ponter A.A. (2011). The influence of a supplement of -carotene given during the dry period to dairy cows on colostrum quality, metabolites and hormones in newborn calves and -carotene status. Animal Feed Science and Technology. 31-37.
35. Kalač P. (2012). Carotenoids, ergosterol and tocopherols in fresh and preserved herbage and their transfer to bovine milk fat and adipose tissues. journal of Agrobiology. 29(1): 1–13.
36. Kawashima, C., Matsui, M., Shimizu, T., Kida, K., Miyamoto, A. (2012). Nutritional factors that regulate ovulation of the dominant follicle during the first follicular wave postpartum in high-producing dairy cows. Journal of Reproduction and Development. 58:10–6.
37. Krishnamoorthy U., Moran J.(2011). Rearing young ruminants on milk replacers and starter feeds. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rim.
38. Kumagai H., Chaipa, Y., Mitani K. (2001). Effects of periparturient vitamin A supplementation on vitamin A concentrations in colostrum and milk from dairy cows, and plasma retinol concentrations, feed intake and growth of their calves. Animal Science Journal. 72:126 – 133.
39. Kume S., Tanabe S. (1993b). Effect of parity of Holstein cows on vitamin A and β-carotene concentrations of colostrum and calf serum. Journal of Animal Science and Technology. 64:987-991.
40. Kume S., Toharmat T. (2000). Effect of colostral β-carotene and vitamin A on vitamin and health status of newborn calves. Livestock Production Science. 68:61-65.
41. LeBlanc S.J., Herdt T.H., Seymour W.M., Duffield T.F., Leslie K.E. (2004). Peripartum serum vitamin E, retinol and beta-carotene in dairy cattle and their association wirh disease. Journal Dairy Science. 87:609-619.
42. LfL - Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (2017). Gruber Tabelle zur Fütterung der Milchkühe, <www.LfL.bayern.de>. Pristupljeno 20. Kolovoza 2018.
43. Li Y., Wongsiriroj N., Blaner S. W. (2014). The multifaceted nature of retinoid transport and metabolism. HepatoBiliary Surgery and Nutrition. 3:126-39.
44. Lotthammer K.H. (1979). Importance of β-carotene for the fertility of dairy cattle. Feedstuffs. 52:36–38.
45. Lotfollahzadeh, S. (2015). Effect of parenteral administration of aitamin A in late pregnant cows on vitamin A status of neonatal. International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering. 12:1248-12521.

46. McDowell L.,R. (2000). Reevaluation of the metabolic essentiality of the vitamins. Journal of Animal Science. 13:115.
47. McDowell L.,R. (2008). Vitamins in Animal and Human Nutrition, Second Edition. Iowa State University Press, Ames.
48. Meschy F. (2007). Alimentation minérale et vitaminique des ruminants: actualisation des connaissances. Productions Animales. 20:119-128.
49. Michal J.J., Heirman L.R., Wong T.S. i Chew B.P. (1994). Modulatory effects of dietary cows. Journal Dairy Science. 5:1408-21.
50. Mogensen L., Kristensen T., Søegaard K., Jensen S.K., Sehested J. (2012). Alfa-tocopherol and beta-carotene in roughages and milk in organic dairy herds. Livestock Science. 145:44–54.
51. Moran J. B. (2002). Calf Rearing: A practical guide, 2nd. Landlinks, CSIRO, Melbourne.
52. Morrissey P.A., Hill T.R. (2009). Fat soluble vitamins and vitamin C in milk and milk Products. U:Advanced Dairy Chemistry. 527-589. Springer, New York.
53. National Research Council (2001). Nutrient requirements of diary cattle. 7th edition. Natl. Acad. Press, Washington DC.
54. Noziere, P., Grolier, P., Durand, D., Ferlay, A., Pradel, P., Martin, B. (2006b). Variations in carotenoids, fat-soluble micronutrients, and color in cow's plasma and milk following changes in forage and feeding level. Journal od Dairy Science. 89: 2634-2648.
55. Nonnecke B.J., Horst R.L., Waters W.R., Dubeski P., Harp J.A. (1999). Modulation of fat-soluble vitamin concentrations and blood mononuclear leukocyte populations in milk replacer-fed calves by dietary vitamin A and β-carotene. Journal Dairy Science. 82:2632 – 2641.
56. Nonnecke B. J., Horst R. L., Hammell D. C., Franklin S. T. (2000). Effects of supplemental vitamin A on retinoic acid concentrations in the plasma of preruminant calves. International Journal of Vitamin and Nutrition Research. 70:27–31.
57. Nonnecke B.J., Roberts M.P., Godkin J.D., Horst R.L., Hammell D.C. i Franklin S.T. (2001). Influence of supplemental, dietary vitamin A on retinol-binding protein concentrations in the plasma of preruminant calves. Journal Dairy Science. 84:641-648.
58. Oldham E.R., Eberhart R.J. i Muller L.D. (1991). Effects of supplemental vitamin A and β-carotene during the dry period and early lactation on udder helath. Journal Dairy Science. 74:3775.
59. Olson, J.A. (1984). Vitamin A. In “Handbook of Vitamins,” (L.J. Machlin, ed.). Marcel Dekker, Inc., New York.
60. Parker A.J., Goopy J.P., Callaghan M.J. (2017). Vitamin A deficiency in *Bos indicus* heifers fed a wheat straw diet cannot be corrected with algae lick blocks or intramuscular injectable retinyl palmitate treatments. Animal Production Science. 57:79-84.

61. Parrish D.B., Bartley E.E., Burris D.U., McIntyre R.T. (1953). Properties of the colostrum of the dairy cow. 8. Digestibility of colostrum and milk by calves during the early postnatal days of life. Journal Dairy Science. 36:489-494.
62. Prache S., Priolo A., Jailler H., Dubroeucq H., Micol D., Martin B. (2002). Traceability of grass-feeding by quantifying the signature of carotenoid pigments in herbivores meat, milk and cheese. Grassland Science in Europe. 7:592–593.
63. Puvogel G., Baumrucker C.R., Sauerwein H., Ruhl R., Ontsouk E., Hammon H.M., Blum J.W. (2005). Effects of an enhanced vitamin A intake during the dry perion on retionoids, lactoferin, IGF system, mammary gland wpithelial cell apoptosis, and subsequent lactation in diary cows. Journal Diary Science. 88:1785-1800.
64. Puvogel G., Baumrucker C. i Blum J.W. (2008). Plasma vitamin A status in calves fed colostrum from cows that were fed vitamin A during late pregnancy. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 92: 614-620.
65. Quigley J.D., Martin K.R., Bemis D.A., Potgieter L.N.D., Reinemeyer C.R., Rohrbach B.W. (1995). Effects of housing and colostrum feeding on serum immunoglobulins, growth, and fecal scores of Jersey calves. Journal Dairy Science. 78:893-901.
66. Raila J., Kawashima C., Sauerwein H., Hülsmann N., Knor, C., Myamoto A., Schweigert F.J. (2017). Validation of blood vitamin A concentrations in cattle: comparison of a new cow-side test (iCheck™ FLUORO) with high-performance liquid chromatography (HPLC). BMC Veterinary Research. 13:126-132.
67. Reboul E., Berton A., Moussa M., Kreuzer C., Crenon I., Borel P. (2006). Pancreatic lipase and pancreatic lipase-related protein 2, but not pancreatic lipase-related protein 1, hydrolyze retinyl palmitate in physiological conditions. Biochimica et Biophysica Acta. 1761:4–10.
68. Reichard J., Lehmann B., Carlberg C., Varani J., Zouboulis C.C. (2007). Vitamin as hormones. Home Metabe Res. 39:71-84.
69. Rode L.M., McAllister T.A., Cheng K.J. (1990). Microbial degradation of vitamin A in rumen fluid from steers fed concentrate, hay or straw diets. Canadian Journal of Animal Science. 70:227.
70. Stout M.A., Benoist D.M., Drake M.A. (2018). Technical note: Simultaneous carotenoid and vitamin analysis of milk from total mixed ration-fed cows optimized for xanthophyll detection. Journal Dairy Science. 101:4906–4913.
71. Thomas J. W., Moore L.A. (1952). Plasma and storage levels of vitamin A and carotene in relation to intake by calves on different diets. Journal Dairy Science. 35:687–692.
72. Tjoelker L.W., Chew B.P., Tanaka T.S. i Daniel L.R. (1988). Bovine vitamin A and beta-carotene intake and lactation status. 2.Responsiveness of mitogen stimulated peripheral blood lymphocytes to vitamin A and beta-carotene challenge in vitro. Journal Dairy Science. 71:3120.

73. Tomlinson J.E., Hemken R.W., Mitchell G.E., Tucker R.E. (1975). Mammary transfer of vitamin A alcohol and ester in lactating dairy cows. Journal Dairy Science. 59:607 – 613.
74. Torsein M., Lindberg A., Sandgren C.H., Waller K.P., Törnquist M., Svensson C. (2011). Risk factors for calf mortality in large Swedish dairy herds. Preventive Veterinary Medicine. 99:136–47. Acta Veterinaria Scandinavica. 60:7-21.
75. Torsein M., Lindberg A., Svensson C., Jensen S.K., Berg C., Persson-Waller K. (2018). α-Tocopherol and β-carotene concentrations in feed, colostrum, cow and calf serum in Swedish dairy herds with high or low calf mortality. Acta Veterinaria Scandinavica. 60:7.
76. Vogel S., Gamble M.G., Blaner W.S. (1999). Biosynthesis, absorption, metabolism and transport of retinoids. In: Retinoids. Springer, New York, NY.
77. Waldner C.L., Blakley B. (2014). Evaluating micronutrient concentrations in liver samples from abortions, stillbirths, and neonatal and postnatal losses in beef calvesThe Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 26:376–89.
78. Waldner C. L., Uehlinger F. D. (2017). Factors associated with serum vitamin A and vitamin E concentrations in beef calves from Alberta and Saskatchewan and the relationship between vitamin concentrations and calf health outcomes. Canadian Journal of Animal Science. 97:65-82.
79. Weiss W.P., Smith K.L., Hogan J.S., Steine T.E. (1995). Effects of forage to concentrate ratio on disappearance of vitamins A and E during in vitro ruminal fermentation. Journal Dairy Science. 78: 1837.
80. Weiss W.P. (2014). Trace minerals and vitamins for dairy cows. Ruminant Nutrition Symposium, Gainesville, Florida.
81. Wikipedia (2017). Vitamin A, <https://hr.wikipedia.org/wiki/Vitamin_A>. Pristupljeno 17. kolovoz 2018.
82. Wise G. H., Caldwell M. J., Hughes J. S. (1946). The effect of the prepartum diet of the cow on the viotamin A reserves of her newborn offspring. Science. 17:616–618.
83. Wu G. (2018). Principles of Animal Nutrition. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA.
84. Wynn P. C., Sheehy P. A. (2013). Minor proteins, including growth factors. Springer, New York.
85. Yonekura L., Nagao A. (2007). Intestinal absorption of dietary carotenoides. Molecular nutrition and Food Research. 51:107-115.
86. Zanker I.A., Hammo, H.M., Blum, J.W. (2000). Beta-carotene, retinal and alpha-tocopherol status in calves fed the first colostrum at 0-2, 6-7, 12-13 ili 24-25 hours after birth. International journal for vitamin and nutrition research. 70:305-310.
87. Zempleni J., Rucker B.R., McCormick B.D., Suttie W.,J. (2007). Handbook of vitamins. CRC Press, New York.

8. Prilozi

Prilog 1. Koncentracije β-karotena i retinola u plazmi teladi prvi dan i kolosturmu

		Plazma, µg/dL		Kolostrum, µg/dL	
Redni broj	**Tele**	**β-karoten**	**Retinol**	**β-karoten**	**Retinol**
1	9278	20	4,3	138,2	227,3
2	9273	20,7	5,0	27,3	54,5
3	9280	83,2	9,1	126,7	220,4
4	9284	2,4	4,7	87,1	210,0
5	9286	11,4	12,6	14,9	55,0
6	9287	2,1	27,2	22,7	65,1
7	9288	0,5	3,4	141,1	227,9
8	9289	0,6	4,4	66,7	114,1
9	9290	0,8	4,6	108,8	200,6
10	9291	8,9	9,8	105,7	138,6
11	9295	9,2	9,6	27,0	84,5
12	9299	11,3	13,9	9,2	50,1
Prosjek		14,3	9,0	73,0	137,3

Prilog 2. Koncentracije β-karotena i retinola u plazmi teladi treći dan i prijelaznom mlijeku

		Plazma µg/dL		Prijelazno mlijeko µg/dL ST	
Redni broj	**Broj teleta**	**β-karoten**	**retinol**	**β-karoten**	**retinol**
1	9278	4,0	7,4	11,04	25,4
2	9273	3,1	8,2	8,7	24,3
3	9280	6,5	8,6	21,30	51,8
4	9284	6,4	8,7	6,4	20,1
5	9286	6,0	8,2	9,3	31,8
6	9287	4,9	7,1	5,2	17,9
7	9288	5,7	8,6	4,7	20,1
8	9289	6,4	8,4	5,5	23,3
9	9290	5,9	8,1	2,8	14,6
10	9291	5,6	7,8	22,2	47,8
11	9295	2,1	9,2	7,6	25,6
12	9299	1,9	6,8	9,4	32,4
Prosjek		4,9	7,3	9,5	27,9

Prilog 3. Koncentracije β-karotena i retinola u plazmi teladi 21. i 42. dana starosti

Plazma µg/dL					
		Dan 21		Dan 42	
Redni broj	**Broj teleta**	**β-karoten**	**Retinol**	**β-karoten**	**Retinol**
1	9278	11,3	12,0	3,8	8,8
2	9273	6,9	7,2	3,6	8,9
3	9280	8,0	8,5	3,3	9,5
4	9284	7,4	6,9	4,4	9,5
5	9286	4,9	8,9	4,6	10,4
7	9288	6,1	8,2	3,8	11,7
11	9295	6,8	7,2	4,5	9,6
12	9299	7,8	8,0	3,6	9,8
Prosjek		7,4	8,4	3,9	9,8

ŽIVOTOPIS

Santina Pamić je rođena 8. veljače 1995. u Puli, odrasla je u Sv. Petru u Šumi. Osnovnu školu je završila u OŠ Vladimira Nazora Pazin, PŠ Sv. Petar u Šumi. Upisala je Gimnaziju i strukovnu školu Jurja Dobrile smjer Opća gimnazija (2009.-2011.) te se kasnije prebacila u Veterinarsku školu, Zagreb (2011.-2013.). Nakon položene državne mature upisala je Agronomski fakultet, smjer Animalne znanosti te završetkom preddiplomskog studija (2016.) upisuje smjer Hranidba životinja i hrana kojeg još pohađa, a obranom ovog diplomskog steći će titulu magistre inžinjerke Hranidbe životinja i hrane. Od stranih jazika aktivno se služi engleskim jezikom, a poznaje i osnove talijanskog i njemačkog jezika. Voli životinje, posebice pse i konje, te bi se njima htjela baviti u budućnosti.