

Univerza v Ljubljani  
*Veterinarska* fakulteta



Jaka Jakob Hodnik

**VPLIV ULTRAVIJOLIČNEGA-B SEVANJA MED  
ROBOTSKO MOLŽO NA KONCENTRACIJO  
VITAMINA D V KRVI KRAV MOLZNIC ČRNO-BELE  
PASME**

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2023





Univerza v Ljubljani  
*Veterinarska* fakulteta



UDK: 636.2:615.832.3:577.161.2:637.115(043.3)

Jaka Jakob Hodnik, dr. vet. med.

**VPLIV ULTRAVIJOLIČNEGA-B SEVANJA MED ROBOTSKO  
MOLŽO NA KONCENTRACIJO VITAMINA D V KRVI KRAV  
MOLZNIC ČRNO-BELE PASME**

Doktorska disertacija

**THE INFLUENCE OF ULTRAVIOLET-B IRRADIATION  
LIMITED TO ROBOT MILKING TIME ON BLOOD VITAMIN  
D CONCENTRATION IN HOLSTEIN-FRISIAN DAIRY COWS**

Doctoral thesis

Ljubljana, 2023



Jaka Jakob Hodnik

## Vpliv ultravijoličnega-B sevanja med robotsko molžo na koncentracijo vitamina D v krvi krav molznic črno-bele pasme

Delo je bilo opravljeno na Oddelku za zdravstveno varstvo prežvekovalcev Klinike za reprodukcijo in velike živali Veterinarske fakultete v Ljubljani.

Javni zagovor je bil opravljen:

Mentor: prof. dr. Jože Starič, dr. vet. med.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

predsednik: prof. dr. Robert Frangež, dr. vet. med.

član: izr. prof. dr. Ožbalt Podpečan, dr. vet. med.

član: izr. prof. dr. Marko Cincović, dr. vet. med.

Izjava o delu:

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



## IZVLEČEK

**Ključne besede:** ultravijolični žarki; vitamin D; eritem, radioterapija; kri, kemične analize; laktacija; govedo.

Z našo raziskavo smo želeli opredeliti varen odmerek UV sevanja za sintezo vitamina D pri kravah molznicah črno-bele pasme in preveriti uporabnost obsevanja z UVB lučjo ozkega spektra, omejenega na čas robotske molže za sintezo vitamina D. Ugotoviti smo skušali tudi vpliv dolžine dlake in barve kože oziroma dlake na sintezo vitamina D pri govedu. V prvi del raziskave smo vključili 21 krav in telic črno-bele pasme z dveh kmetij, ki smo jih z naraščajočimi odmerki z UVB lučjo obsevali na 8 odlakanih in na 8 obrutih mestih. V drugi del raziskave smo vključili 51 krav črno-bele pasme, ki smo jih na podlagi mlečnosti v predhodni laktaciji, dneva po telitvi in deleža črne dlake na hrbtu enakomerno in naključno razdelili v tri skupine. Krave v prvi skupini smo obrili vsaka dva tedna in jih obsevali z odmerkom  $80 \text{ J/m}^2$ , krave v drugi skupini z maksimalnim odmerkom, ki ga je dopuščala dnevna robotska molža, a ni presegala  $360 \text{ J/m}^2$ , tretja skupina krav pa je bila kontrolna skupina. V času raziskave smo kravam štirikrat odvzeli kri, in sicer prvi dan ter 7 dni, 30 dni in 60 dni po začetku obsevanja, ter z uporabo avtomatske imunsko-encimske fluorescenčne metode določili koncentracijo 25-hidroksivitamina D. V prvem delu postopka smo ugotovili, da se rdečina na beli koži pojavi pri odmerku UVB  $329 \text{ J/m}^2$ , na odlakani koži pa pri odmerku UVB  $5595 \text{ J/m}^2$ , ter da je slednji odmerek linearno odvisen od dolžine dlake in da je za povzročitev rdečine na odlakani koži potreben značilno višji odmerek. V drugem delu raziskave smo ugotovili, da je v času robotske molže mogoča sinteza vitamina D pod vplivom UVB luči ozkega valovnega spektra. V povprečju so največ vitamina D proizvedle obrite krave ( $13,37 \text{ ng/mL}$ ), sledile so odlakane krave ( $9,96 \text{ ng/mL}$ ), medtem ko so najmanj vitamina D proizvedle krave iz kontrolne skupine ( $5,11 \text{ ng/mL}$ ). Ugotovili smo, da je sinteza vitamina D v koži odvisna tudi od barve kože, medtem ko vpliva barve dlake na sintezo vitamina D nismo potrdili. Naša raziskava je prva raziskava o konkretni opredelitvi minimalnega odmerka UVB za povzročitev rdečine pri kravah molznicah črno-bele pasme na standardiziran način in omogoča primerjavo odmerkov med različnimi raziskavami. Ker ugotovljeni odmerek v zmernih geografskih širinah zlahka presežemo, je pomembno, da imajo krave na paši zavetje, kamor se lahko umaknejo z neposrednega sončnega sevanja. Ugotovili smo tudi vpliv dlake in barve kože na kožno sintezo vitamina D pri kravah črno-bele pasme in ponudili nov način nadomeščanja vitamina D, ki ne moti dnevne rutine komercialnih farm.



J. J. Hodnik: Vpliv ultravijoličnega-B sevanja... na koncentracijo vitamina D v krvi krav molznic...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2023. Doktorska disertacija

---

**ABSTRACT**

**Key words:** ultraviolet rays; vitamin D; erythema, radiotherapy; blood chemical analysis; lactation; cattle

The goal of our study was to determine a safe UV irradiation dose for vitamin D supplementation in dairy cows of the Holstein Friesian breed and to investigate the utility of narrow-band UVB irradiation limited to robot milking time for vitamin D supplementation. We also wanted to determine the influence of hair and skin and/or hair colour on cutaneous vitamin D synthesis in cattle. For the first part of our study, we enrolled 21 cows and heifers of the Holstein Friesian breed from two farms. We irradiated them with a raising dose of irradiation using a narrow-band UVB light on 8 hair-covered and 8 shaven areas. In the second part of the study, we enrolled 51 cows of the Holstein Friesian breed, which we split into three equal and random groups based on milk yield in the previous lactation, days after calving and the percent of black hair on the back. The first group was shaven every two weeks and irradiated with a dose of  $80 \text{ J/m}^2$ , the second group was irradiated with a maximum dose daily robot milking time would allow but did not exceed  $360 \text{ J/m}^2$ , the third group served as a control group. During the study the cows were blood sampled four times on the first and at 7 days, 30 days and 60 days after the start of irradiation and the concentration of 25-hydroxyvitamin D was determined using an automated immune enzyme fluorescence method. In the first part of the study, we found that erythema on shaven will appear at a dose of  $329 \text{ J/m}^2$  and on haired skin at a dose of  $5595 \text{ J/m}^2$  and that the latter dose was linearly dependent on hair length, therefore, a significantly higher dose is needed to produce erythema on haired skin. In the second part of our study, we found that vitamin D supplementation using a narrow-band UVB light limited to robot milking time is possible. On average the shaven cows produced the most vitamin D ( $13,37 \text{ ng/mL}$ ), followed by the haired group ( $9,96 \text{ ng/mL}$ ), while the control group produced the least vitamin D ( $5,11 \text{ ng/mL}$ ). We also found that cutaneous vitamin D synthesis is dependent on skin colour; however, we could not confirm an effect of hair colour. This study is the first to determine the minimal erythema dose in Holstein Friesian dairy cattle in a standardised way, which allows the comparison of doses between different studies. The determined doses are easily exceeded at mild latitudes; therefore, it is important that cattle on pasture have shelter where they can get out of direct sun irradiation. We also found an effect of hair and skin colour on cutaneous vitamin D production in Holstein Friesian cattle and put forward a new way of vitamin D supplementation that does not interfere with daily farm routine.

J. J. Hodnik: Vpliv ultravijoličnega-B sevanja... na koncentracijo vitamina D v krvi krav molznic...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2023. Doktorska disertacija

---

J. J. Hodnik: Vpliv ultravijoličnega-B sevanja... na koncentracijo vitamina D v krvi krav molznic...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2023. Doktorska disertacija

---

J. J. Hodnik: Vpliv ultravijoličnega-B sevanja... na koncentracijo vitamina D v krvi krav molznic...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2023. Doktorska disertacija

---

**KAZALO VSEBINE**

<b>IZVLEČEK</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>6</b>
<b>KAZALO VSEBINE</b> .....	<b>10</b>
<b>KAZALO TABEL</b> .....	<b>13</b>
<b>KAZALO SLIK</b> .....	<b>15</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>19</b>
1.1 NAMEN.....	19
1.2 HIPOTEZE .....	19
<b>2 PREGLED LITERATURE</b> .....	<b>21</b>
2.1 BARVA ČRNO-BELEGA GOVEDA .....	21
<b>2.1.1 Zaščitni učinek eumelanina</b> .....	<b>23</b>
2.2 ULTRAVIJOLIČNA SVETLOBA .....	23
<b>2.2.1 Določanje MED</b> .....	<b>26</b>
<b>2.2.2 Škodljivi učinki UV sevanja</b> .....	<b>27</b>
<b>2.2.3 Pozitivni učinki UV sevanja</b> .....	<b>28</b>
2.3 VITAMIN D .....	30
<b>2.3.1 Presnova vitamina D</b> .....	<b>31</b>
<b>2.3.2 Vloga vitamina D pri govedu</b> .....	<b>33</b>
<b>2.3.3 Priporočila glede krmljenja vitamina D<sub>3</sub> kravam molznicam</b> .....	<b>36</b>
<b>2.3.4 Zastrupitev z vitaminom D</b> .....	<b>36</b>
2.4 MOLZNI ROBOT .....	37
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>39</b>
3.1 DOVOLJENJE KOMISIJE ZA DOBROBIT .....	39
3.2 DOLOČANJE MED .....	39
<b>3.2.1 Živali</b> .....	<b>39</b>

<b>3.2.2. UV luč</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2.3 Obsevanje</b> .....	<b>41</b>
<b>3.2.4. Statistična analiza podatkov</b> .....	<b>45</b>
3.3 SPOSOBNOST SINTEZE VITAMINA D V KOŽI POD VPLIVOM OBSEVANJA MED ROBOTSKO MOLŽO .....	45
<b>3.3.1 Živali</b> .....	<b>45</b>
<b>3.3.2 Analiza krme</b> .....	<b>45</b>
<b>3.3.3 UV luč</b> .....	<b>47</b>
<b>3.3.4 Obsevanje</b> .....	<b>47</b>
<b>3.3.5 Vzorčenje</b> .....	<b>50</b>
<b>3.3.6 Analiza krvi</b> .....	<b>50</b>
<b>3.3.7 Statistična analiza podatkov</b> .....	<b>51</b>
3.4 VPLIV DLAKE IN BARVE DLAKE OZ. KOŽE NA SINTEZO VITAMINA D V KOŽI .....	51
<b>3.4.1 Merjenje deleža črne obarvanosti</b> .....	<b>51</b>
<b>3.4.2 Preostali materiali in metode za preiskavo tretje hipoteze</b> .....	<b>52</b>
<b>4 REZULTATI</b> .....	<b>53</b>
4.1 DOLOČANJE MED .....	53
4.2 SPOSOBNOST SINTEZE VITAMINA D V KOŽI POD VPLIVOM OBSEVANJA MED ROBOTSKO MOLŽO .....	55
<b>4.2.1 Skupine</b> .....	<b>55</b>
<b>4.2.2 Vitamin D</b> .....	<b>56</b>
4.3 VPLIV DLAKE IN BARVE DLAKE OZ. KOŽE NA SINTEZO VITAMINA D V KOŽI .....	58
<b>4.3.1 Hemogram in biokemija</b> .....	<b>60</b>
<b>4.3.2 Ocena kondicije</b> .....	<b>60</b>

<b>4.3.3 Dolžina dlake .....</b>	<b>60</b>
<b>4.3.4. Prيرهja mleka .....</b>	<b>61</b>
<b>5 RAZPRAVA.....</b>	<b>64</b>
5.1 DOLOČANJE MED .....	64
5.2 SPOSOBNOST SINTEZE VITAMINA D V KOŽI POD VPLIVOM OBSEVANJA MED ROBOTSKO MOLŽO .....	67
<b>5.2.1 Vitamin D.....</b>	<b>67</b>
5.3 VPLIV DLAKE IN BARVE DLAKE OZ. KOŽE NA SINTEZO VITAMINA D V KOŽI .....	68
<b>5.3.1 Hemogram in biokemija .....</b>	<b>69</b>
<b>5.3.2 Prيرهja mleka .....</b>	<b>69</b>
<b>6 SKLEPI .....</b>	<b>71</b>
<b>7 POVZETEK.....</b>	<b>72</b>
<b>8 SUMMARY .....</b>	<b>74</b>
<b>9 ZAHVALE .....</b>	<b>77</b>
<b>10 LITERATURA .....</b>	<b>78</b>
<b>11 PRILOGE.....</b>	<b>90</b>
11.1 TABELE PARAMETROV HEMOGRAMA .....	90
11.2 TABELE VREDNOSTI DIFERENCIALNE BELE KRVNE SLIKE.....	92
11.3 TABELE VREDNOSTI BIOKEMIJSKIH PARAMETROV .....	94
11.4 MNENJE KOMISIJE ZA DOBROBIT ŽIVALI NA VETERINARSKI FAKULTETI .....	96



**KAZALO TABEL**

Tabela 1: Protokol obsevanja za določanje MED .....	42
Table 1: Irradiation protocol for MED determination.....	42
Tabela 2: Sestava krmne mešanice (enolončnice), ki so jo dnevno pokladali na kravo v dveh obrokih.....	46
Table 2: Composition of total mixed ration fed daily per cow in two meals .....	46
Tabela 3: Sestava močnih krmil po hranilnih snoveh.....	47
Table 3: Nutritional composition of concentrated feeds .....	47
Tabela 4: Rezultati določanja minimalnega odmerka za povzročitev rdečine (MED).....	54
Table 4: Results of minimal erythema dose (MED) determination .....	54
Tabela 5: Primerjava skupin pri prvem vzorčenju z enosmerno ANOVA ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) in p-vrednosti .....	56
Table 5: Comparison of groups at first sampling with one-way ANOVA ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) with p-values .....	56
Tabela 6: Opisna statistika celokupnega 25-hidroksivitamina D (25(OH)D) po skupinah in vzorčenjih ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ). .....	58
Table 6: Descriptive statistics of total 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) by study groups and samplings ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ). .....	58
Tabela 7: Opisna statistika ocene telesne kondicije in p-vrednosti razlik med skupinami in med vzorčenji pri posamezni skupini.....	60
Table 7: Descriptive statistics of body condition scoring and p-values of the differences between groups and samplings within groups .....	60

Tabela 8: Sprememba dolžine dlake v odlakani skupini .....	61
--	----

Table 8: Change in hair length in the haired group .....	61
--	----

Tabela 9: Prireja mleka po skupinah .....	62
---	----

Table 9: Milk yield by group .....	62
------------------------------------	----

**KAZALO SLIK**

Slika 1: Prenos melanosomov .....	22
Figure 1: Transfer of melanosomes.....	22
Slika 2: Povezanost med relativnim učinkom obsevanja in različnimi valovnimi dolžinami UV sevanja. ....	25
Figure 2: Connection between the relative effects of UV irradiation with different wavelengths.....	25
Slika 3: Sinteza vitamina D v koži .....	30
Figure 3: Vitamin D synthesis in skin .....	30
Slika 4: Moč obsevanja glede na valovno dolžino. ....	40
Figure 4: The power of irradiation weighted by wavelength. ....	40
Slika 5: UV LED luč in UV luč s šablono premera 1 cm.....	41
Figure 5: UV LED light and UV light with a 1 cm diameter template. ....	41
Slika 6: UV luč, pričvrščena na kravo s prijemalkami Rochester-Pean.....	43
Figure 6: UV lamp attached to a cow with Rochester-Pean forceps.....	43
Slika 7: Mesto obsevanja na obriti koži.....	44
Figure 7: Irradiation area on shaven skin. ....	44
Slika 8: Obsevanje krave z UV LED lučjo, nameščeno v molznega robota Fullwood Merlin 225 .....	48
Figure 8: Irradiation of a cow with the UV LED light mounted into the milking robot Fullwood Merlin 225 .....	48

Slika 9: Programa Fullwood MerlinView in LabVIEW .....	49
Figure 9: Programs Fullwood MerlinView and LabVIEW .....	49
Slika 10: Model linearne regresije odvisnosti med dolžino dlake in minimalnim odmerkom za povzročitev rdečine na odlakani koži (MED-H) .....	55
Figure 10: Linear regression model of the correlation of hair length and minimal erythema dose of haired skin (MED-H) .....	55
Slika 11: Razlika med koncentracijo 25-hidroksivitamina D (25(OH)D) pri 1. vzorčenju ter koncentracijami pri 2., 3. in 4. vzorčenju po skupinah.....	57
Figure 11: Difference in 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) concentration at 1 <sup>st</sup> sampling and the concentration at 2 <sup>nd</sup> , 3 <sup>rd</sup> , 4 <sup>th</sup> sampling in different groups. ....	57
Slika 12: Odvisnost razlike v koncentraciji 25-hidroksivitamina D (25(OH)D) med 1. in 4. vzorčenjem ter deležem črne kože na mestu obsevanja .....	59
Figure 12: Correlation of the difference in 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) concentration between 1 <sup>st</sup> and 4 <sup>th</sup> sampling and percent of black skin at the irradiation area .....	59
Slika 13: Prireja mleka v odvisnosti od časa pri kravah, vključenih v raziskavo.....	63
Figure 13: Milk yield in relation to time in cows enrolled in the study .....	63

## SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

25(OH)D – 25-hidroksivitamin D

1,25(OH)<sub>2</sub>D – 1,25-dihidroksivitamin D

ABCB1 – poddružina B ATP vezoče kasete član 1 (*angl.* ATP binding cassette subfamily B member 1)

BCS – ocena telesne kondicije (*angl.* body condition score)

CIE – Mednarodna komisija za osvetlitev (*fran.* Commission internationale de l'éclairage)

DCT – dopakrom tautomeraza

DNK – deoksiribonukleinska kislina

$E^D$  – dominantni *Extension* alel

$e$  – recesivni *Extension* alel

$E^+$ ,  $E^1$  in  $E^2$  – divji tip *Extension* alela

ELFA – encimsko sklopljena fluorescentna analiza (*angl.* Enzyme Linked Fluorescent Assay)

FGF-23 – fibroblastni rastni dejavnik 23

GGT – gama glutamil transferaza

GLDH – glutamat dehidrogenaza

HPLC/MS – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, sklopljena z masno spektrometrijo

IL – interlevkin

KIT – protoonkogen receptor tirozin kinaze (*angl.* proto-oncogene receptor tyrosine kinase)

LED – svetleča dioda (*angl.* light emitting diode)

mA – miliamper

MC1R – melanokortin 1 receptor (*angl.* melanocortin 1 receptor)

MED – minimalni odmerek UV sevanja, potreben za povzročitev rdečine na koži (*angl.* minimal erythema dose)

MED-S – minimalni odmerek UV sevanja, potreben za povzročitev rdečine na obriti koži

MED-H – minimalni odmerek UV sevanja, potreben za povzročitev rdečine na odlakani koži

MITF – z mikroftalmijo povezan transkripcijski dejavnik (*angl.* microphthalmia-associated transcription factor)

$\alpha$ -MSH –  $\alpha$ -melanocyte stimulirajoči hormon (*angl.*  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone)

nm – nanometer

PAX3 – parni škatlasti gen 3 (*angl.* paired box gene 3)

PAX5 – parni škatlasti gen 5 (*angl.* paired box gene 5)

PTH – paratiroidni hormon

RANTES – reguliran ob aktivaciji normalnih celic T, izražen in izločen (*angl.* regulated on activation normal T-cell expressed and secreted)

SCC – ploščatocelični karcinom

SED – standardni odmerek UV sevanja za povzročitev rdečine

SEM – standardna napaka povprečja

UV – ultravijoličen

V – volt

VDBP – vitamin D vezoči protein (*angl.* vitamin D binding protein)

## 1 UVOD

Vitamin D je pri kravah najbolj poznan po odločilni vlogi pri presnovi kalcija in fosfatov, novejša raziskava pa ga povezujejo tudi z delovanjem imunskega sistema (Nelson in sod., 2012; Yue in sod., 2018). Krave se naravno oskrbujejo z vitaminom D preko krme ali z lastno sintezo v koži. Ker je večina krav vzrejena v hlevih, tj. brez neposredne izpostavljenosti sončnim ultravijoličnim (UV) sevanjem, so živali odvisne od količine vitamina D v krmi, ki pa ni vedno najboljše izkoristljiv (Hymøller in Jensen, 2011).

Kožna sinteza vitamina D lahko poteka tudi v hlevskih pogojih z uporabo UV luči, a so v dosedanjih raziskavah uporabljali UV luči, ki so za doseganje zadovoljivih odmerkov UV sevanja in s tem zadovoljivo sintezo vitamina D potrebovale sorazmerno veliko časa (Jakobsen in sod., 2015; Hymøller in sod., 2017). Do zdaj še nobenemu raziskovalcu ni uspelo dokazati vpliva razmerja med črno in belo barvo kože oziroma dlake na sintezo vitamina D pri kravah (Hymøller in Jensen, 2012; Jakobsen in sod., 2015; Hymøller in sod., 2017). Pri ljudeh sinteza vitamina D poteka optimalno pri relativno nizkih valovnih dolžinah med 295 nm in 300 nm oz. celo pri 293 nm z uporabo luči UV LED (*angl.* light emitting diode) (MacLaughlin in sod., 1982; Kalajian in sod., 2017), kar bi lahko izkoristili za bolj učinkovito obsevanje tudi pri govedu.

### 1.1 NAMEN

V raziskavi smo želeli ugotoviti, ali lahko krave, ki so izpostavljene UVB sevanju ozkega spektra, zgolj v času robotske molže sintetizirajo dovolj vitamina D za fiziološke potrebe. Zanimalo nas je tudi, kako dolžina dlake in delež črne obarvanosti dlake oz. kože na mestu obsevanja vplivata na koncentracijo vitamina D v krvi. Da je raziskava potekala varno za živali, smo morali določiti minimalni odmerek UVB sevanja nizkih valovnih dolžin, ki je potreben za povzročitev rdečine (*angl.* minimal erythema dose, MED) pri kravah črno-bele pasme, in ugotoviti, kako dolžina dlake vpliva na nastanek rdečine.

### 1.2 HIPOTEZE

1. MED krav molznic črno-bele pasme, izpostavljenih UVB (280–315 nm) na mestih belega obarvanja, presega enkratni odmerek  $10\,000\text{ J/m}^2$ .
2. Za vzdrževanje fiziološke koncentracije vitamina D pri trajno uhlevljenih kravah molznicah črno-bele pasme je v vseh fizioloških pogojih dovolj obsevanje, omejeno na čas robotske molže z UVB ozkega valovnega spektra, ki ne presega MED krav.

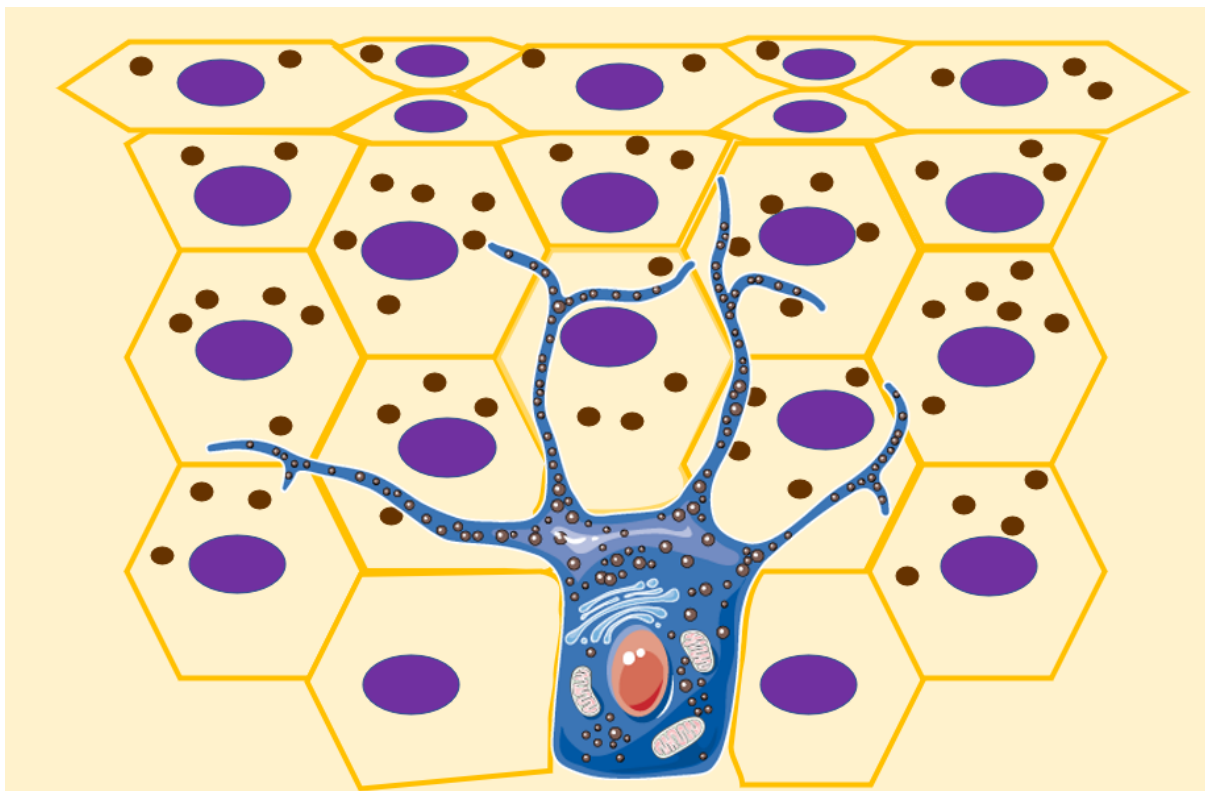
3. Dlaka in delež črne in bele barve kože oziroma dlake na mestu obsevanja imata vpliv na koncentracijo vitamina D v krvi.



## 2 PREGLED LITERATURE

### 2.1 BARVA ČRNO-BELEGA GOVEDA

Obarvanost kože in dlake pri govedu je odvisna od koncentracije melanocitov in s tem tudi prisotnosti melanosomov v koži oziroma dlaki. Melanociti se nahajajo v bazalni plasti povrhnjice kože, kjer v specializiranih celičnih organelih (melanosomih) izdelujejo kožna pigmenta eumelanin in feumelanin (Gutiérrez-Gil in sod., 2007) (Slika 1). Melanociti lahko melanosome preko svojih dendritičnih podaljškov predajo drugim celicam, kot so keratinociti povrhnjice, in celicam dlačnih foliklov, kar koži oziroma dlaki da značilno barvo (Hanel in Carlberg, 2020). Melanosomi s keratinociti ob luščenju kože potujejo v višje plasti. Osnovna barva pri govedu je odvisna od razmerja v izražanju kožnih pigmentov eumelanina (črnorjava barva) in feumelanina (rdečerumena barva) v koži oziroma dlaki. Kateri pigment bo prevladal, določa encim tirozinaza. Visoka aktivnost tirozinaze spodbuja nastanek eumelanina, nizka aktivnost tirozinaze pa nastanek feumelanina. Za izdelavo feumelanina je dodatno potrebna še aminokislina cistein (Kollias in sod., 1991). Aktivacija tirozinaze je odvisna od aktivacije melanokortin 1 receptorja (MC1R), zato stimulacija MC1R z  $\alpha$ -melanocit-stimulirajočim hormonom ( $\alpha$ -MSH) spodbuja nastanek eumelanina. Feumelanin se poveča ob izostanku  $\alpha$ -MSH ali okvari oz. blokadi MC1R (Burchill in sod., 1986; Maresca in sod., 2015). Najbolje poznani antagonist MC1R je protein Aguti, ki se veže na MC1R in prepreči vezavo  $\alpha$ -MSH (Gutiérrez-Gil in sod., 2007; García-Borrón in sod., 2014). Genetsko je tvorjenje pigmenta odvisno od izražanja alela *Extension* ali MC1R lokusa na 18. kromosomu, pri čemer so dominantne živali ( $E^D$ ) črne, recesivne ( $e$ ) pa rdeče. Omenjena alela nista občutljiva na protein Aguti. Živali z mešanico črne in rdeče dlake imajo Aguti občutljive alele *Extension*, kot so  $E^+$ ,  $E^1$  in  $E^2$  (Adalsteinsson in sod., 1995; Royo in sod., 2005; Gutiérrez-Gil in sod., 2007; Schmutz, 2012).



Slika 1: Prenos melanosomov

Prenos melanosomov (rjavi krogci) iz melanocitov (modra celica) v celice povrhnjice kože (rumene celice)  
Povzeto po Hanel in Carlberg (2020).

Figure 1: Transfer of melanosomes.

Transfer of melanosomes (brown circles) from melanocytes (blue cell) to epithelial skin cells (yellow cells).  
Adapted from Hanel in Carlberg (2020).

Bele lise pri živalih so posledica izostanka melanocitov na teh področjih kože. Pigmentne celice izvirajo iz nevralnega grebena in v času embrionalnega razvoja migrirajo po telesu. Te celice se nato diferencirajo v melanoblaste z izražanjem genov, kot so z mikroftalmijo povezan transkripcijski faktor (MITF), protoonkogen receptor tirozin kinaza (KIT) in dopakrom tautomeraza (DCT). Melanoblasti nato migrirajo v epidermis, kjer se diferencirajo v melanocite in tvorijo pigment kože in dlake. Prekinitev procesa v kateri koli fazi povzroči izostanek melanocitov v koži in s tem belo pigmentacijo teh predelov (Jivanji in sod., 2019). Ta vrsta belega obarvanja se imenuje »piebald« (Schmutz, 2012). Na mestih »piebald« histološko

najdemo malo ali celo nič melanocitov (Spritz, 1994). Pri govedu so bele lise in njihov obseg najverjetneje odvisni od izražanja gena MITF (22. kromosom), ki ga povezujemo z vlogo pri diferenciaciji in preživetju melanocitov (D'Mello in sod., 2016); gena KIT (6. kromosom), ki je ključen za preživetje in migracijo melanoblastov ter diferenciacijo melanocitov (Baxter in sod., 2004); gena PAX3 (2. kromosom), ki deluje kot transkripcijski faktor za MITF, in gena PAX5 (8. kromosom) (Liu in sod., 2009; Hayes in sod., 2010; Jivanji in sod., 2019).

### **2.1.1 Zaščitni učinek eumelanina**

Eumelanin absorbira fotone UV sevanja bolje pri nižjih valovnih dolžinah. Velja obratno sorazmerje med absorpcijo in valovno dolžino sevanja (Meredith in Sarna, 2006). Dodatno deluje tudi kot lovilec kisikovih radikalov, ki v koži nastanejo pod vplivom UV sevanja (Maresca in sod., 2015). To dejstvo je pomembno, saj kisikovi radikali in neposredni učinek UV sevanja povzročajo poškodbe DNK in zato delujejo karcinogeno. Pri ljudeh se večina melanina nahaja ob bazalni membrani epidermisa (Saager in sod., 2015), pri govedu pa je večina telesa pokrita z gosto dlako, a njenega zaščitnega učinka še ne poznamo v celoti. Zaščitni učinek barve in dlake lahko delno pripišemo dejstvu, da se pri govedu kožne novotvorbe pogosteje pojavljajo na slabo odlakanih in pigmentiranih mestih, kot so veke in vulva (Laws, 2013). Dlaka goveda je različno prepustna za UV sevanje. Prepustnost je odvisna od gostote dlake (Bianca in Wegmann, 1974) in verjetno tudi od barve dlake. Pri ljudeh so ugotovili, da rjavi lasje prepuščajo le približno 20 % UV žarkov valovnih dolžin 290–400 nm, kar ne velja za bele lase, pri katerih se prepustnost povečuje od približno 18 % pri 290 nm do približno 60 % pri 400 nm. Razliko lahko pripišemo višjim koncentracijam eumelanina v rjavih laseh in boljši prodornosti višjih valovnih dolžin UV sevanja (Lerche in sod., 2017). Poleg barve na prepustnost vplivajo tudi orientacija, debelina in gostota las (Laws, 2013; de Gálvez in sod., 2015).

## **2.2 ULTRAVIJOLIČNA SVETLOBA**

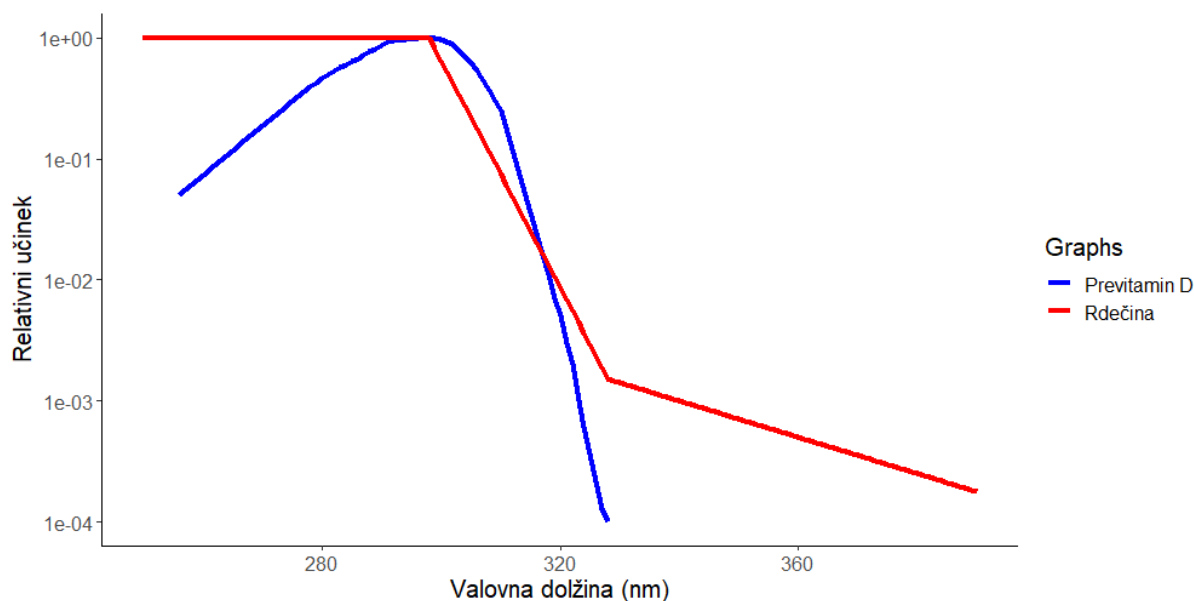
UV sevanje glede na valovno dolžino razdelimo v tri razrede, in sicer UVC 100–280 nm, UVB 280–315 nm in UVA 315–400 nm. Za mejo med UVB in UVA se v literaturi pojavljata dve številki, in sicer 315 nm in 320 nm (CIE 209:2014). V naši raziskavi smo upoštevali mejo 315 nm. Sončno UV sevanje, ki doseže zemljo, je sestavljeno pretežno iz sevanja UVA (95 %) in v manjšini iz sevanja UVB (5 %). Sevanje UVC zaustavi že ozonska plast zemlje. Odmerek UV sevanja, ki smo mu izpostavljeni, je odvisen od debeline ozonske plasti, zenitnega kota sonca

(tj. kota med lokalno vertikalno osjo in soncem), oblačnosti, odsevnosti talnih površin, nadmorske višine in onesnaženosti zraka. Ozonski plašč, oblačnost in onesnaženost zraka zmanjšujejo količino UV sevanja, ki doseže zemljino površino. Zenitni kot sonca je odvisen od časa v dnevu, letnega časa in geografske širine. Najmanjši je ob ekvatorju, okoli poldneva in v poletnem času. Večji kot je zenitni kot, manj UV sevanja nas doseže oziroma se spremeni njegova sestava, saj sončno sevanje, ki zaradi večjega zenitnega kota potuje skozi debelejšo plast ozona, vsebuje manj UVB sevanja (IARC, 1992). Dnevni odmerki UV sevanja lahko povzročijo rdečino, predvsem UVB, ki se spreminjajo skozi leto in na podobnih geografski širinah kot Slovenija ( $46^\circ$  N) znašajo od  $< 500 \text{ J/m}^2$  do  $> 5000 \text{ J/m}^2$  (Reuder in Koepke, 2005; Rieder in sod., 2008; Bilbao in de Migue, 2020). Na južni polobli pri podobnih geografskih širinah ( $45^\circ$  S) dnevni odmerek lahko preseže  $7500 \text{ J/m}^2$  na dan (McKenzie in Lucas, 2018). Na prejeti odmerek vpliva odsevnost talnih površin, saj lahko dobro odbojne površine, kot je sneg, odbijajo do 90 % UV sevanja, a večina talnih površin odbije manj kot 10 % sevanja (IARC, 1992; Lerche in sod., 2017).

Različne valovne dolžine sončnega UV sevanja, ki doseže zemljo, imajo različne biološke učinke, največjega UVB. Biološki učinki, za katere poznamo vplive sevanja v odvisnosti od valovnih dolžin, sta na primer povzročitev rdečine in pretvorba 7-dihidroholesterola v previtamin  $D_3$ . Obe krivulji sta sprejeti s strani Mednarodne komisije za osvetlitev (CIE) in omogočata standardizacijo odmerkov med različnimi viri UV sevanja. Za povzročitev rdečine so optimalne valovne dolžine 250–298 nm, nato pa se učinek s povečevanjem valovne dolžine zmanjšuje (ISO 17166:1999) (

Slika 2). Učinke različnih valovnih dolžin na sintezo previtamina  $D_3$  v koži so prvi preučevali MacLaughlin in sod. (1982) in ugotovili, da optimalna sinteza poteka pri valovnih dolžinah 295–300 nm (

Slika 2). Pozneje je to krivuljo povzela tudi CIE (CIE 174:2006). Ugotovitve novejših raziskav kažejo, da lahko z uporabo luči LED optimalna sinteza poteka tudi pri nižjih valovnih dolžinah (Kalajian in sod., 2017).



Slika 2: Povezanost med relativnim učinkom obsevanja in različnimi valovnimi dolžinami UV sevanja

Povezanost med valovnimi dolžinami UV sevanja in povzročitvijo rdečine ter pretvorbo 7-dehidroholesterol v previtamin D<sub>3</sub> v koži. Povzeto in prirejeno po ISO 17166 (1999) in CIE 174 (2006).

Figure 2: Connection between the relative effects of UV irradiation with different wavelengths

Connection of UV irradiation and erythema production and 7-dihydrocholseterol to pre-vitamin D<sub>3</sub> conversion in the skin, respectively. Adapted from ISO 17166 (1999) and CIE 174 (2006).

Za podajanje moči UV sevanja uporabljamo enoto  $W/m^2$ , za merjenje odmerka pa  $J/m^2$  (=  $W/m^2 \cdot s$ ). Poljudno, torej v javnosti, intenzivnost sončnega UV sevanja podajamo kot UV indeks, ki je moč sončnega UV sevanja, preračunana na krivuljo za povzročitev rdečine (ISO 17166:1999). UV indeks 1 predstavlja  $25 mW/m^2$  (Kinney in sod., 2000; Lerche in sod., 2017). V Španiji lahko UV indeks preseže 10, na južni polobli pa celo 14 (McKenzie in Lucas, 2018; Bilbao in de Migue, 2020). Druge enote za podajanje odmerka UV sevanja so standardni odmerek UV sevanja za povzročitev rdečine (SED), ki znaša  $100 J/m^2$ . SED je preračunan na krivuljo za povzročitev rdečine (ISO 17166:1999). Podoben kot SED je minimalni odmerek za povzročitev rdečine (MED), ki je specifičen za vsakega posameznika in je odvisen od pigmenta kože in predhodne izpostavljenosti UV sevanju. Kadar ga določamo vizualno, je njegova ocena subjektivna. MED podajamo v  $J/m^2$  ali v SED. MED je pri ljudeh z najbolj bledo poltjo

približno  $200 \text{ J/m}^2$  oziroma 2 SED (Fitzpatrick, 1988). Za merjenje odmerka za pretvorbo 7-dihidroholesterola v previtamin  $\text{D}_3$  lahko uporabljamo standardni odmerek UV za sintezo vitamina D in znaša  $100 \text{ J/m}^2$ , pri čemer je učinkovitost valovnih dolžin UV sevanja preračunana na krivuljo pretvorbe 7-dihidroholesterola v previtamin  $\text{D}_3$  (Slika 2) (CIE 174:2006; McKenzie in sod., 2014).

### 2.2.1 Določanje MED

Pri ljudeh določamo MED za ugotavljanje primerne odmerka UV za zdravljenje kožnih bolezni, kot so luskavica, ekcem, akne itd. Vrednost MED je pri ljudeh odvisna od prirojene barve polti, debeline kože ter predhodne izpostavljenosti UV sevanju in je specifična za vsakega posameznika (Heckman in sod., 2013) ter znaša  $100\text{--}2000 \text{ J/m}^2$  (Fitzpatrick, 1988; Sachdeva, 2009). Temnost polti in MED sta premo sorazmerna. Enako velja tudi za predhodno izpostavljenost UV sevanju. Ker vsi predeli kože niso enako izpostavljeni UV sevanju, je za določitev MED pomembna tudi izbira mesta obsevanja. Kot najbolj relevanten rezultat uporabljamo mesto, ki je čim manj izpostavljeno naravnemu UV sevanju (npr. koža na notranji strani podlakta ali ritnicah). MED določamo s šablonami, ki omogočajo izpostavitve kože različnim odmerkom UV sevanja. Rezultate testiranja ocenjujemo po 24 urah. Najnižji odmerek, ki je povzročil zaznavno rdečino ali rdečino z jasnimi mejami, je MED za tistega posameznika (Heckman in sod., 2013). Pri govedu ne obstaja standardni protokol določanja MED, a lahko uporabljamo podoben protokol kot za ljudi. Za razliko od ljudi so krave po večini telesa pokrite z gosto dlako, ki nudi UV zaščito, a gostota in dolžina dlake na vseh predelih nista enaki (Bianca in sod., 1974; Udo, 1978). Posebnost je tudi, da imajo nekatere pasme lisasto obarvanje. Iz podatkov pri ljudeh in živalih lahko sklepamo, da imajo svetlejši deli z manj melanina nižjo vrednost MED (Fitzpatrick, 1988). Tako lahko pri kravah določimo dve vrednosti MED – eno za odlakano kožo in eno za obrito kožo. Pri kravah ne obstaja standardizirana krivulja za povzročitev rdečine, a se po vsej verjetnosti ne razlikuje pomembno od vrednosti, ki se uporablja za ljudi. Podatek o MED pri kravah v literaturi ni jasno opredeljen, saj je podan samo odmerek  $100 \text{ J/m}^2$  brez določenih uporabljenih valovnih dolžin in podane relativne učinkovitosti valovnih dolžin za povzročitev rdečine, ki so jo uporabili pri svojem izračunu (Mehlhorn in Steiger, 1975). V novejši raziskavi na kravah kljub višjemu odmerku UVB valovne dolžine  $280\text{--}320 \text{ nm}$  ( $2430 \text{ J/m}^2$ ) na obriti koži niso ugotovili rdečine (Morrow in sod., 2001), a odmerka niso preračunali na krivuljo za povzročitev rdečine (ISO 17166:1999). Pri upoštevanju krivulje je njihov odmerek znašal le  $176 \text{ J/m}^2$ , kar še vedno presega odmerek,

naveden v literaturi. V raziskavi, v kateri so neobrite krave en mesec obsevali z odmerkom, preračunanim na krivuljo za povzročitev rdečine (ISO 17166:1999)) 2400 J/m<sup>2</sup>, tudi ta ni povzročil rdečine (Hymøller in sod., 2017).

### **2.2.2 Škodljivi učinki UV sevanja**

Pri govedu so najbolj pogost škodljiv učinek UV sevanja sončne opekline, ki so predvsem posledica UV sevanja kratkih valovnih dolžin (Rowe, 1989). Največkrat se pojavijo na slabo odlakanih in obarvanih delih kože.

Kronična izpostavljenost UV sevanju vodi v nastanek ploščatoceličnega karcinoma (SCC), najpogosteje na področju neodlakane kože okrog oči in vulve. Pojavnost (incidenca) SCC je večja pri živalih s svetlejšo pigmentacijo okoli oči in pri živalih, ki so izpostavljene večji količini UV sevanja (Anderson, 1991; Pausch in sod., 2012). Večja je tudi na področjih z nižjo geografsko širino in višjo nadmorsko višino ter je odvisna od časa izpostavljenosti soncu (Tsujita in Plummer, 2010; Schmalwieser in sod., 2018). Pri miših so največjo pojavnost tumorjev ugotovili pri valovnih dolžinah približno 293 nm, vendar ima tudi UVA sevanje karcinogene učinke (de Gruijl, 1995). Ugotovljena valovna dolžina je lahko posledica slabše prodornosti nižjih valovnih dolžin skozi kožo in boljše sinteze pigmenta pri višjih valovnih dolžinah, ki varuje kožo pred nadaljnjimi poškodbami. Pri testiranju UVB luči ozkega in širokega spektra z maksimalno močjo pri valovni dolžini (313 nm) so ugotovili, da UVB luč ozkega spektra bolj pogosto povzroča rakave spremembe na koži pri odmerku 1 MED (El-Ghorr in Norval, 1997). V etiologijo SCC naj bi bili vpleteni tudi herpesvirus in papiloma virusi (Tsujita in Plummer, 2010). Zaradi svetle obarvanosti glave je pasma Hereford nagnjena k nastanku SCC na področju oči, a se lahko SCC pojavi tudi pri drugih pasmah, najpogosteje lateralno na očesni veznici ter na meji med roženico in beločnico (Tsujita in Plummer, 2010). Pojavnost SCC se s starostjo povečuje, kar je lahko posledica daljše celokupne izpostavljenosti karcinogenim učinkom, na primer UV sevanju, ali pešajoči imunosti s staranjem živali (Heeney in Valli, 1985). Tudi umetni viri UV sevanja lahko povzročijo SCC pri govedu (Kopecky in sod., 1979). SCC je ekonomsko pomemben, saj zmanjšuje prirast živali ter poveča verjetnost predčasne izločitve in zaseg trupov v klavnici zaradi tumorskih sprememb, ki so posledica zasevkov. SCC najpogosteje zaseva v področne bezgavke in pljuča (Heeney in Valli, 1985; Tsujita in Plummer, 2010), pri govedu pa se lahko pojavi tudi na vulvi. Podobno kot pri očeh na pojavnost SCC na vulvi vpliva pigmentacija (Schmalwieser in sod., 2018). Pojavnost SSC v

ZDA pri pasmi Hereford je 0,8–5 %, medtem ko je pri preostalih pasmah le 0,8–1,6 % in se s padajočo geografsko širino povečuje. Na Nizozemskem so po pregledu 35.000 živali ugotovili, da je pojavnost SCC le 0,04 %. Diagnozo SCC postavimo na podlagi tipičnega videza in umeščenosti ter jo lahko potrdimo s citološko preiskavo odtisa spremembe na objektnem stekelcu ali s histopatološko preiskavo vzorca tkiva, pridobljenega z biopsijo (Tsujita in Plummer, 2010).

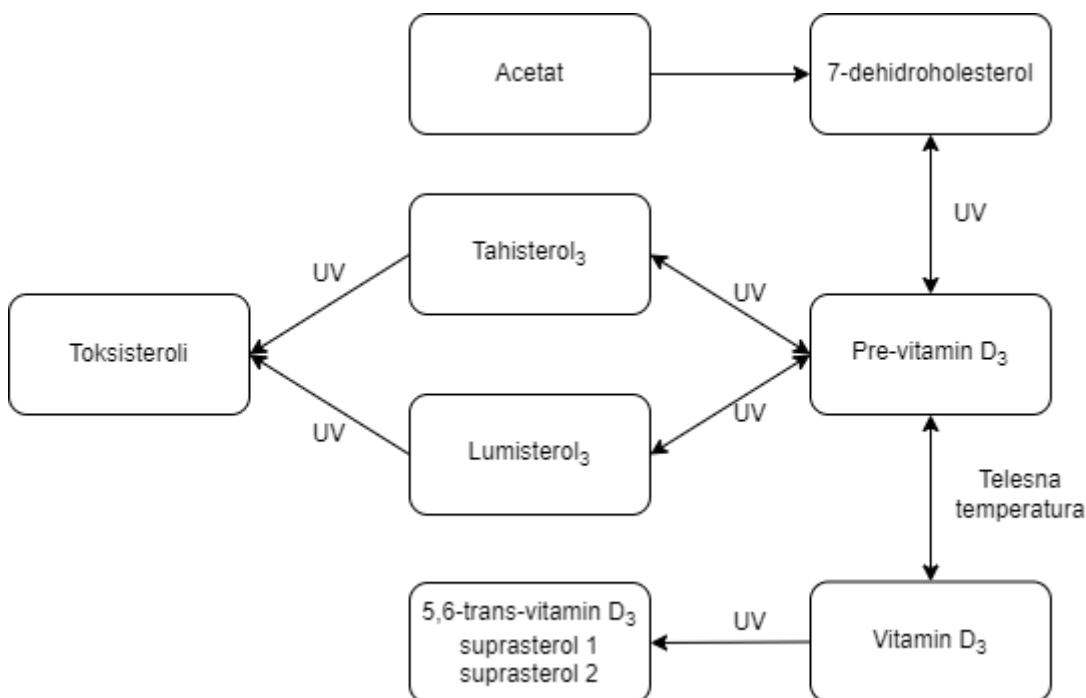
Tretji negativen učinek UV sevanja je fotosenzibilizacija, ki podobno kot sončne opekline in SSC prizadene predvsem slabo odlakana področja in pigmentirano kožo. Za razliko od sončnih opeklin jo povzroča UV sevanje višjih valovnih dolžin (> 320 nm). Fotosenzibilizacijo delimo na tri tipe: i) primarna fotosenzibilizacija, ki nastane zaradi zaužitja toksičnih snovi v rastlinah (hipericin, furanokumarin, fagopirin), ii) fotosenzibilizacija zaradi proizvodnje fotosenzibilnih pigmentov (porfirini) in iii) hepatogena fotosenzibilizacija, ki nastane zaradi poškodbe jeter in zmanjšane razgradnje toksičnih presnovkov (Rowe, 1989).

### 2.2.3 Pozitivni učinki UV sevanja

Poglavitni pozitiven učinek UV sevanja je sinteza vitamina D<sub>3</sub>. Sinteza vitamina D<sub>3</sub> v koži se začne s proizvodnjo 7-dehidroholesterola iz acetata v povrhnjici kože (epidermis). 7-dehidroholestrol je vezan na celične membrane celic povrhnjice kože, njegove koncentracije pa so največje v bazalni plasti (*lat. stratum basale*) in trnasti plasti (*lat. stratum spinosum*) (Herrmann in sod., 2017). UVB sevanje prekine vez med ogljikoma C9 in C10 7-dehidroholesterola in nastane previtamin D<sub>3</sub>, ki se nato pod vplivom telesne temperature izomerizira v vitamin D<sub>3</sub> (Hymøller in sod., 2009). Pri ljudeh se 80 % previtamina D<sub>3</sub> izomerizira v vitamin D<sub>3</sub> v 8 urah (Holick, 1995). Pod vplivom nadaljnjega UV sevanja se lahko previtamin D<sub>3</sub> izomerizira v lumisterol<sub>3</sub>, tahisterol<sub>3</sub> in toksisterole, vitamin D<sub>3</sub> pa v 5,6-trans-vitamin D<sub>3</sub>, suprasterol 1 ali suprasterol 2. Izomerizacija med različnimi presnovki onemogoča sintezo prevelikih količin vitamina D<sub>3</sub> (Slika 3) (van Dijk in sod., 2016). Optimalna pretvorba 7-dehidroholestrola v previtamin D<sub>3</sub> poteka pri valovnih dolžinah 295–300 nm. Pri 295 nm se vzpostavi ravnovesje, pri katerem 55–65 % predstavlja previtamin D<sub>3</sub>, 25–30 % tahisterol<sub>3</sub>, 5–10 % lumisterol<sub>3</sub> in 2–5 % 7-dehidroholestrol, medtem ko pri simulirani sončni svetlobi le 20 % predstavlja previtamin D<sub>3</sub>, 3–6 % tahisterol<sub>3</sub>, 50–60 % lumisterol<sub>3</sub> in 10–20 % 7-dehidroholesterol (MacLaughlin in sod., 1982). Razlika nastane zaradi različne občutljivosti teh presnovkov na višje valovne dolžine UV sevanja. Previtamin D<sub>3</sub> in tahisterol<sub>3</sub> sta bolj



občutljiva na valovne dolžine, večje od 315 nm, zato pri obsevanju s sončno svetlobo lumisterol<sub>3</sub> in 7-dehidroholesterol zavzmeta večji delež ravnovesja (MacLaughlin in sod., 1982). Pri ljudeh na sintezo previtamina D<sub>3</sub> vpliva tudi koncentracija melanina v koži, saj je pri temnejših osebkih potreben daljši čas obsevanja za sintezo enake količine previtamina D<sub>3</sub> (Holick in sod., 1981). Pri živali sintezo vitamina D<sub>3</sub> v koži dodatno ovira dlaka, saj otežuje proizvodnjo, a je ne onemogoči, ker govedo proizvaja vitamin D<sub>3</sub> s celotno površino kože in ne samo na manj odlakanih predelih (Hymøller in Jensen, 2010a). Obrbite ovce imajo večje koncentracije vitamina D od neobritih (Dittmer in Thompson, 2011; Kohler in sod., 2013). Tudi barva dlake oz. kože vpliva na kožno proizvodnjo vitamina D, saj imajo v enakih okoljskih pogojih temnejše alpake nižje koncentracije vitamina D od svetlejših (Judson in sod., 2008). Pri odraslem govedu vpliva razmerja med črno in belo barvo dlake na kožno sintezo vitamina D<sub>3</sub> niso opredelili še v nobeni raziskavi (Hymøller in Jensen, 2012; Jakobsen in sod., 2015; Hymøller in sod., 2017). V afriški raziskavi so ugotovili, da imajo svetlejša teleta več 25(OH)D<sub>3</sub> in 25(OH)D kot temnejša (Callaby in sod., 2020).



Slika 3: Sinteza vitamina D v koži

Povzeto po van Dijk in sod. (2016).

Figure 3: Vitamin D synthesis in skin

Adapted from van Dijk in sod. (2016).

### 2.3 VITAMIN D

Vitamin D je esencialni vitamin za človeka in veliko živali, tudi za govedo. Govedo lahko naravno pridobi vitamin D na dva načina – z uživanjem krme oz. krmnih dodatkov, ki vsebujejo vitamin D, ter z lastno sintezo vitamina D v koži. V krmi je lahko vitamin D v dveh oblikah, kot holekalciferol ali vitamin D<sub>3</sub> in ergokalciferol ali vitamin D<sub>2</sub> (Nelson in sod., 2016a). Holekalciferol je živalskega izvora, a lahko njegove presnovke najdemo tudi v nekaterih rastlinah (Mello, 2003). Ergokalciferol najdemo v rastlinski krmi. Pod vplivom sončne svetlobe ga proizvajajo glive, ki rastejo na rastlinah (Hymøller in Jensen, 2011; Jäpelt in Jakobsen, 2013; Nelson in sod., 2016a). Govedo iz krme bolje izkorišča holekalciferol (Hymøller in Jensen,

2010b, 2011; Duffy in sod., 2018). Ker je celoletna sinteza vitamina D pri višjih geografskih širinah onemogočena in ker se veliko goveda vzreja izključno v hlevih brez izpostavljenosti neposrednemu sončnemu sevanju, je govedo odvisno od količine vitamina D v voluminozni krmni oz. vitaminskih krmnih dodatkih (Holcombe in sod., 2018). Trpežna ljuljka lahko vsebuje 2,8–255,6 IU/kg vitamina D<sub>2</sub> (povprečno 80 IU) pri 19,2 % suhe snovi. Koncentracija je odvisna od letnega časa in izpostavljenosti soncu. Krava z maso 700 kg lahko na dan z zaužitjem 22,4 kg suhe snovi iz takšne paše pridobi 320–29880 IU vitamina D<sub>2</sub> na dan (Jäpelt in sod., 2011). Lucernino seno lahko vsebuje do 1920 IU/kg vitamina D<sub>2</sub> (% suhe snovi ni podan) (Horst in sod., 1984). Poleg izpostavljenosti soncu in metode konzerviranja na koncentracijo vitamina D<sub>2</sub> vpliva tudi zrelost rastlin oz. prisotnost odmrlih listov, ki vsebujejo več gliv, ki tvorijo vitamin D<sub>2</sub> (Jäpelt in Jakobsen, 2013). V Evropi je kot krmni dodatek za govedo registriran le vitamin D<sub>3</sub> (Uredba (ES) No 1831/2003). Izvedbena uredba komisije (EU) 2017/1492 določa, da je maksimalna količina vitamina D<sub>3</sub> v krmni za odraslo govedo 4000 IU/ kg oz. 10000 IU/kg v mlečnih nadomestkih za teleta.

### 2.3.1 Presnova vitamina D

Vitamin D<sub>3</sub>, ki je sintetiziran v koži, preide v kri zaradi vezave na vitamin D vezoče proteine (DBP), ki ga lipoproteini transportirajo v celice jeter (Holick in sod., 1980; Ziv in sod., 1985; Dusso in sod., 2005; Herrmann in sod., 2017). Vitamin D<sub>3</sub>, sintetiziran v koži, se v krvni obtok sprošča počasi. Po enkratnem UV obsevanju lahko traja tudi tri dni, preden se v celoti resorbira iz kože v kri (Holick in sod., 1980).

Vitamin D se v prebavilih absorbira z aktivnim transportom v tankem črevesu. Absorpcija poteka s pomočjo proteinov, odgovornih za absorpcijo maščob in holesterola (Reboul in sod., 2011). Prenos poteka s pomočjo treh proteinov. Prvi je zbiralni receptor razreda B tipa I (*angl.* scavenger receptor class B type I), prisoten v dvanajstniku in kolonu, drugi je seženska determinanta 36 (*angl.* cluster determinant 36), prisotna v dvanajstniku in jejunumu, in tretji Niemann-Pick C1-podoben znotrajcelični holesterolni transporter 1 (*angl.* Niemann-Pick C1-like intracellular cholesterol transporter 1), ki se nahaja v enterocitih. Vitamin D se nato vgradi v hilomikrone in preide v limfo (Reboul, 2015). Iz prebavil pride v kri hitreje kot pri kožni sintezi (vrh resorpcije je 10–12 ur po zaužitju) in je vezan na hilomikrone, lipoproteine in DBP (Reboul, 2015).

V jetrih poteče prva hidrosilacija na 25. ogljikovem atomu (glavni encim je CYP2R1), pri čemer nastane 25-hidroksivitamin D (25(OH)D). Maksimalna koncentracija 25(OH)D v krvi je

dosežena 24–48 ur po UVB obsevanju (Krause in sod., 1998; Mostafa in Hegazy, 2013). Razpolovni čas 25(OH)D pri govedu je 16–32 dni in je odvisen od starosti, saj so imele krave v drugi laktaciji krajši razpolovni čas kot krave v tretji laktaciji (Wilkens in sod., 2013).

Zaradi dolgega razpolovnega časa, majhnih kratkoročnih nihanj in relativno visokih koncentracij 25(OH)D uporabljamo za določanje oskrbljenosti organizma z vitaminom D. Je tudi skupni presnovek sintetiziranega in zaužitega vitamina D ter zaradi minimalnega internega uravnavanja dobro odraža sezonsko nihanje, nadomeščanje in povezavo z boleznimi kosti (Dusso in sod., 2005; Herrmann in sod., 2017). Zlati standard za merjenje 25(OH)D je tekočinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo (Holick, 2009), a imajo tudi nekatere imunsko-encimske metode, kot je VIDAS® 25-OH Vitamin D Total assay (bioMérieux, Marcy l’Etoile, Francija) primerljive rezultate. S slednjo metodo lahko izmerimo celokupni 25(OH)D, tako tistega, ki je vezan na vitamin D vezoče proteine (VDBP), kot tudi prosto obliko (Moreau in sod., 2016).

Vežan na DBP se 25(OH)D prenese v ledvice, kjer se v celicah proksimalnih ledvičnih cevok ponovno hidroksilira, tokrat na prvem ogljikovem atomu (encim CYP27B1), pri čemer nastane 1,25-dihidroksivitamin D (1,25(OH)<sub>2</sub>D), ki je aktivna oblika vitamina D. Podobno kot 25(OH)D je tudi 1,25(OH)<sub>2</sub>D v krvi večinoma vezan na VDBP in albumine (Bikle in sod., 1985). Hidroksilacija v 1,25(OH)<sub>2</sub>D lahko poteka tudi v drugih tkivih, npr. v kosteh, posteljici, prostati, keratinocitih, makrofagih, limfocitih, epitelnih celicah debelega črevesa in v trebušni slinavki. Vendar 1,25(OH)<sub>2</sub>D, ki nastane zunaj ledvice, deluje le na lokalni ravni (Dusso in sod., 2005; Herrmann in sod., 2017). Ker večina celic nima receptorja megalin/kubulin (imajo ga celice v obščitnici, posteljici in skeletnih mišicah), ne morajo uporabljati 25(OH)D, vezanega na VDBP, in so odvisne od prostega 25(OH)D v krvi (Bikle, 2020).

Glavno vlogo pri vzdrževanju koncentracije 25(OH)D igrajo skeletne mišice, saj ga stalno sproščajo in absorbirajo ter s tem podaljšujejo njegovo življenjsko dobo v cirkulaciji. Absorpcija in sproščanje 25(OH)D v mišicah uravnava paratiroidni hormon (PTH) (Abboud in sod., 2017). Zaloge presnovkov vitamina D v skeletnih mišicah so sestavljene pretežno iz presnovkov vitamina D<sub>3</sub>, saj so presnovki vitamina D<sub>2</sub> le tretjina vseh zalog. Koncentracije obeh oblik vitamina D so odvisne od letnega časa. Njune koncentracije so v skeletnih mišicah največje na koncu poletja (Cashman in sod., 2020), a sta sezonsko nihanje in razmerje najverjetneje odvisni od dostopnosti do sončnega sevanja in razmerja med oblikami vitamina

D v krmi, ki jo zaužijejo živali. Zaloge 25(OH)D najdemo tudi v maščevju, a v maščevju ni dostopen, dokler ne pride do mobilizacije maščobnih kislin za energijo (Rybchyn in sod., 2020). Katabolizem vitamina D se začne v proksimalnih ledvičnih cevkah, kjer se hidroksilira na 24. ogljikovem atomu (encim CYP24A1), s čimer nastane 24,25-dihidroksivitamin D oz. 1,24,25-trihidroksivitamin D. Končni produkt njegove razgradnje je kalcitroična kislina, ki se izloči z žolčem (Dusso in sod., 2005; Herrmann in sod., 2017). Isti encim hidroksilira 1,25(OH)D na 23. ogljikovem atomu in tvori 1,25(OH)D-26,23-lakton, ki se tudi izloči z žolčem (Jones in sod., 2014). Vitamin D in 25(OH)D se lahko neposredno izločata v svetlino črevesa skozi enterocite, kar je še en mehanizem uravnavanja koncentracije vitamina D v telesu. Miši, ki so jim izbili gen za transporter podružine B ATP vezoče kasete član 1 (ABCB1), so imele večje koncentracije 25(OH)D kot vrstniki v naravi (Margier in sod., 2019).

Ključni regulator koncentracije presnovkov vitamina D v krvi je encim CYP27B1, ki 25(OH)D pretvarja v 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Na njegovo delovanje vplivajo 1,25(OH)<sub>2</sub>D neposredno ali posredno preko zaviranje sinteze paratiroidnega hormona, ki spodbuja izražanje CYP27B1. Spodbuja tudi nastajanje fibroblastnega rastnega dejavnika-23 (FGF-23), ki zavira izražanje CYP27B1. Delovanje encima zavira tudi povečan vnos kalcija in fosfatov. FGF-23 in 1,25(OH)<sub>2</sub>D spodbujata izražanje encima za katabolizem vitamina D (CYP24A1) (Herrmann in sod., 2017).

### 2.3.2 Vloga vitamina D pri govedu

1,25(OH)<sub>2</sub>D deluje preko vitamin D-receptorja (VDR) v citoplazmi celic. Vezava 1,25(OH)<sub>2</sub>D na VDR sproži aktivacijo receptorja, ki nato tvori kompleks z retinoid X-receptorjem. Kompleks se translocira v jedro in veže s promotorsko regijo ciljnih genov ter sproži transkripcijo oziroma supresijo genov (Ramagopalan in sod., 2010). 1,25(OH)<sub>2</sub>D deluje tudi neposredno na receptorje na celičnih membranah in lahko aktivira različne signalne poti, na primer gvanilat ciklazo, fosfatidilinozitol-3-kinazo, ciklično adenozin monofosfatazo, z mitogenom-aktivirane proteinske kinaze, protein kinazo A, fosfolipazo C, odprtje različnih, od napetosti odvisnih kalcijevih in klorovih kanalov, ter mobilizacijo kalcija iz sarkoplazemskega retikuluma (Eder in Grundmann, 2022). Neposredno delovanje na transmembransko obliko VDR spodbuja različne pomembne funkcije, kot so absorpcija kalcija v črevesu, izločanje inzulina v celicah trebušne slinavke in številne druge (Saponaro in sod., 2020). Vitamin D je ključni hormon za uravnavanje koncentracije kalcija in koncentracije fosfatov v telesu, saj uravnava izražanje kalcijevih kanalov na apikalni površini enterocitov, transport kalcija skozi enterocite in njegovo izločanje v intersticijsko tekočino, iz katere nato preide v kri. Stimulira

tudi absorpcijo fosfata iz črevesa (Dusso in sod., 2005). Koncentracijo kalcija in fosfatov vzdržuje tudi s povečanjem njune reabsorpcije iz ledvičnih cevok.

Vitamin D je pomemben tudi za razvoj in stabilnost okostja, saj je ključen za uravnavanje osteoblastne sinteze in osteoklastne razgradnje kosti. Prek uravnavanja izločanja PTH zavira diferenciacijo osteoklastov, neposredno pa stimulira osteoblaste, saj spodbuja njihovi proliferacijo in maturacijo (Siddiqui in Partridge, 2016). Izboljša delovanje prirojenega in pridobljenega imunskega sistema, odpornost na kronične bolezni in reprodukcijske motnje ter uravnava lokalno imunost v mlečni žlezi (zmanjša kolonizacijo bakterij in število somatskih celic) (Lippolis in sod., 2011; Nelson in Merriman, 2014). Od imunskih celic vpliva predvsem na makrofage, ki sintetizirajo  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  ob stimulaciji Tollu-podobnih receptorjev. Tudi limfociti B imajo sposobnost tvorbe  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ . V vimenu  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  stimulira nastanek dušikovega oksida in beta-defenzinov, ki imajo protimikrobne učinke (Lippolis in sod., 2011; Merriman in sod., 2015; Poindexter in sod., 2020). Poleg naštetega sproži tudi nastanek kemokina RANTES (*angl.* regulated on activation normal T-cell expressed and secreted), ki na mesto vnetja privablja imunske celice (Merriman in sod., 2015). Aktivna oblika vitamina D zavira proliferacijo  $\text{CD4}^+$  in  $\gamma\delta\text{TCR}^+$  T- limfocitov, kar zavira nastanek interferona gama in interleukina-17 (IL-17), dveh glavni vnetnih citokinov. Poleg teh zniža tudi koncentracijo nekaterih drugih vnetnih citokinov, kot so IL- $1\beta$ , IL-6 in IL-8, ter tumor nekrotizirajočega faktorja- $\alpha$  ter poviša koncentracijo protivnetnega citokina IL-10 (Asgharpour in sod., 2020). Po tem lahko sklepamo, da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , sintetiziran v makrofagih in limfocitih B, parakrino uravnava delovanje limfocitov T (Nelson in sod., 2012). Krave z eksperimentalno povzročenim mastitisom, ki so intramamarno prejele  $25(\text{OH})\text{D}_3$ , so imele v mleku manj bakterij in manj levkocitov ter nižjo telesno temperaturo kot krave v kontrolni skupini (Lippolis in sod., 2011). Na vlogo vitamina D pri imunskem odgovoru kaže tudi dejstvo, da so se njegove koncentracije zmanjšale (za 51 %) ob umetni okužbi z virusom bovine virusne diareje v obratnem sorazmerju s koncentracijami proteinov akutnega vnetja pri teletih, medtem ko so pri kravah v kontrolni skupini ostale enake. Vendar v raziskavi niso poročali, kaj se je zgodilo z vnosom mleka in s tem vitamina D, kar bi lahko vplivalo na rezultat. Koncentracije proteinov akutnega vnetja in vitamina D so določili s testom ELISA (Nonnecke in sod., 2014). Krave s klinično obliko paratuberkuloze so imele nižje koncentracije  $25(\text{OH})\text{D}$  (določene z radioimunološko analizo) kot subklinično okužene in negativne (Stabel in sod., 2019). Nižje koncentracije so ugotovili

tudi pri kravah, ki so bile seropozitivne na okužbo z bakterijo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* v primerjavi z negativnimi kontrolami (Sorge in sod., 2013).

Vitamin D deluje tudi na sintezo rdečih krvnih celic, saj so pri ljudeh ugotovili VDR v celicah kostnega mozga (Zhou in sod., 2010). Pri bolnikih s kronično odpovedjo ledvic je zdravljenje z 1,25(OH)<sub>2</sub>D povečalo vrednosti hemoglobina in hematokrita (Aucella in sod., 2003). V raziskavi na bikih črno-bele pasme so ugotovili negativen vpliv visokih odmerkov vitamina D<sub>3</sub>, vbrizganega intramuskularno (3.300.000–9.900.000 IE), na število belih krvnih celic (limfocitov, granulocitov) ter pozitiven vpliv na hematokrit in hemoglobin 6 dni po dajanju vitamina D<sub>3</sub>. Hematološke vrednosti so določali avtomatsko s števcem krvnih celic (Keywanloo in sod., 2021). Pri kravah molznicah črne-bele pasme niso ugotovili sprememb v številu levkocitov, limfocitov ali monocitov, ko so jim v 29 dneh v krvi dvignili koncentracijo 25(OH)D s 13,5 ng/mL na 28–46,1 ng/mL. Vitamin D so dodajali na različne načine, in sicer z dodajanjem vitamina D<sub>2</sub> in/ali D<sub>3</sub> v krmo, z izpostavljanjem soncu na paši 6,5 ure dnevno ter z dodajanjem D<sub>2</sub> v krmo in s pašo (6,5 ur). Najbolj uspešna metoda dodajanja vitamina D je bila slednja (Yue in sod., 2018).

Vitamin D vpliva tudi na reprodukcijo. V raziskavi iz leta 1971 so ugotovili, da so se krave, ki so prejemale 300.000 IU vitamina D<sub>3</sub> na teden po porodu, vrnil v estrus 16 dni prej in bile breje 37 dni prej kot krave brez nadomeščanja (Ward in sod., 1971). Krave, ki so na dan prejele 40 000 IU vitamina D<sub>2</sub>, so proizvedle več mleka in zaužile več krme kot kontrolna skupina brez dodatka in skupina, ki je prejemale 80.000 IU/dan. Odmerek 80.000 IU/ dan so v raziskavi opredelili kot začetek intoksikacije (National Research Council, 2001).

Pri kravah vrednosti 25(OH)D v krvi pod 5 ng/mL kažejo na absolutno pomanjkanje, ki vodi v rahitis oziroma osteomalacijo (Horst in sod., 1997). Za vzdrževanje homeostaze kalcija in fosfatov naj bi bile koncentracije 25(OH)D v krvi višje od 20 ng/mL. Meja 20 ng/mL je bila določena po raziskavi na ljudeh, v kateri so ugotovili, da vrednosti paratiroidnega hormona dosežejo plato pri tej koncentraciji (Malabanan in sod., 1998). Meja, do katere se povečujejo pozitivni učinki vitamina D v krvi, še ni znana (Nelson in Merriman, 2014). Po porodu krave, ki so imele koncentracijo 25(OH)D 175 ng/mL, niso imele višjih koncentracij 1,25(OH)<sub>2</sub>D, a so imele nižje vrednosti kalcija kot krave s koncentracijo 40 ng/mL (Nelson in Merriman, 2014). Vrednosti 25(OH)D, višje od 30 ng/mL, veljajo za zadovoljive, a je meja povzeta po raziskavah na ljudeh, v katerih so ugotovili, da je resorpcija kalcija iz črevesa večja pri 30

ng/mL oz. da je delovanje imunskega sistema zavrtlo pri nižjih koncentracijah, in ne, da je njegovo delovanje pri tej koncentraciji optimalno (Heaney in sod., 2003; Adams in sod., 2007). Nelson in Merriman (2014) za govedo predlagata optimalne koncentracije 25(OH)D v krvi med 40 ng/mL in 80 ng/mL. Spodnjo mejo sta določila na podlagi dejstva, da bi lahko zaradi individualnih razlik nekatere krave imele koncentracijo nižjo od 20 ng/mL, če bi ciljali na optimalno koncentracijo, nižjo od 40 ng/mL. Za zgornjo mejo sta se odločila, ker raziskave, v kateri bi ugotovili pozitivne učinke pri koncentracijah nad 100 ng/mL, za zdaj ni.

### 2.3.3 Priporočila glede krmljenja vitamina D<sub>3</sub> kravam molznicam

National Reserach Council priporoča krmljenje 30 IU/kg telesne mase/dan vitamina D (National Research Council, 2001), vendar je priporočena koncentracija zaradi povečevanja proizvodnje mleka na kravo od objave priporočil prenizka. V švedski raziskavi na vzorcu krav, ki so jih krmili z 20.000 IU vitamina D<sub>3</sub> na dan (približno 30 IU/kg telesne mase/dan), so imele krave pozimi koncentracije 25(OH)D približno 10 ng/mL (Hymøller in sod., 2009). Kravam v Ameriki v krmo pogosto dodajajo nekajkrat večje koncentracije vitamina D<sub>3</sub>, kot so navedene v priporočilih (Nelson in sod., 2016a). Potrebe po vitaminu D se še povečajo v poporodnem obdobju, kar se odraža z nižjimi koncentracijami vitamina D v krvi po porodu (Holcombe in sod., 2018). Pri teletih priporočajo nadomeščanje s 600 IU/kg suhe snovi (National Research Council, 2001). Nelson in sod. priporočajo nadomeščanje s 6000 IU/kg suhe snovi za doseganje koncentracij 25(OH)D v krvi 50–60 ng/mL (Nelson in sod., 2016a).

### 2.3.4 Zastrupitev z vitaminom D

Vitamin D je ob prekomernem dodajanju v krmo ali ob zaužitju kalcinogenih rastlin lahko tudi toksičen in povzroča kalcifikacijo mehkih tkiv. Z lastno sintezo vitamina D v koži intoksikacija ni mogoča zaradi internih kontrolnih mehanizmov, ki smo jih opisali v prejšnjih poglavjih. Tudi intoksikacija zaradi čezmernega dodajanja je redka. Koncentracije 25(OH)D lahko dosežejo 400 ng/mL v plazmi brez vidnih posledic (Celi in sod., 2018; Tomkins in sod., 2020). Raziskovalni odbor National Research Council poroča, da lahko krave tolerirajo 2200 IE vitamina D<sub>3</sub>/kg krme (priporočilo je 30 IE vitamina D<sub>3</sub>/ kg krme) daljše obdobje (60 dni) in celo 25.000 IE vitamina D<sub>3</sub>/kg krme krajša obdobja (2001). Paranteralni odmerek 15 milijonov IE vitamina D<sub>3</sub> 32 dni pred telitvijo in drugi odmerek 5 milijonov IE vitamina D<sub>3</sub> 7 dni pred telitvijo sta bila toksična za breje krave pasme Jersey (Littledike in Horst, 1980).



Najpomembnejše kalcinogene rastline so *Solanum malacoxylon*, *Cestrum diurnum*, *Trisetum flavescens* in *Nierembergia veitchii*. Slednje vsebujejo 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glikozide ali celo aktivno obliko vitamina D. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glikozidi se aktivirajo v vampu s pomočjo mikrobne prebave, ki odcepi glikozid od 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Klinična znamenja zastrupitve z vitaminom D so hujšanje, podaljšan čas ležanja, težave pri gibanju, povišani frekvenci bitja srca in dihanja ter slabša plodnost, kar vodi v ekonomske izgube v proizvodnji. Na sekciji lahko vidimo obsežne kalcifikacije endokarda, sten velikih žil, pljuč, ledvic in kit. Kljub negativnim učinkom lahko nekatere kalcinogene rastline uporabljamo tudi za preprečevanje hipokalcemije (Mello, 2003).

#### 2.4 MOLZNI ROBOT

Molzni roboti so stroji, ki omogočajo molžo krav brez prisotnosti človeka. Njihova glavna namena sta sprostitev časa, ki ga lastnik lahko nameni drugim dejavnostim, in domnevno večja proizvodnja mleka zaradi bolj pogoste molže (Jacobs in Siegford, 2012; Pitkäranta in sod., 2019). Krave v napravo prihajajo prostovoljno oz. je gibanje v hlevu urejeno tako, da morajo krave skozi, da pridejo od ležalnih boksov do krme. Krave so za prihod v napravo motivirane tudi s krmili, a je v čredi v povprečju še vedno 8 % krav, ki jih moramo na molžo prignati (King in sod., 2016). Molzni robot ima kapaciteto 50–70 krav, odvisno od količine proizvedenega mleka in števila predvidenih dnevnih molž. Robot vsak dan učinkovito molze 20–22 ur, preostali čas pa je namenjen vzdrževanju in čiščenju. Čeprav je robot kravam na voljo tako rekoč cel dan, se še vedno pojavljajo konice povečanega prometa v jutranjih in popoldanskih urah, ki sovpadajo s polaganjem krme (Jacobs in Siegford, 2012; John in sod., 2016). V ameriški raziskavi so ugotovili, da se v povprečju krave molzejo 2,91-krat na dan in da povprečna molža traja 6,84 minute (Tremblay in sod., 2016). Če krava pride na molžo prehitro po predhodni molži, jo robot zavrne. Število zavrnitev na kravo na dan naj bi bilo večje od 1, saj to pomeni, da so krave motivirane za prihod v napravo (Tremblay in sod., 2016). Ob molži molzni roboti merijo določene parametre mleka, kot so količina mleka, delež (%) maščob, delež (%) beljakovin, električna prevodnost in nekateri tudi barva mleka. Oddajniki, nameščeni na živali (na nogi ali okoli vratu), omogočajo, da jih robot prepozna, in imajo zelo pogosto tudi merilnike pospeška, ki zaznavajo aktivnost živali (gibanje). S tem podatkom lahko robot zazna, da se žival goni, in jo izloči v poseben čakalni prostor za osemenitev. Opozarja tudi, ali je krava presegla dovoljeni interval med molžama, in sporoči lastniku, da je potrebno kravo prignati v napravo (Jacobs in Siegford, 2012). Glavne prednosti molznih robotov so sprostitev časa lastnika za druge dejavnosti, pogostejša molža krav, molža vsakega seska posebej,

standardizirana molzna rutina, individualno krmljenje krav ter spremljanje dodatnih parametrov mleka in krav, pomanjkljivosti pa pretirano zanašanje na merilce (odkrivanje gonitve ali vnetja mlečne žleze), potreba po priganjanju nekaterih krav v robota, relativno visoka cena robota, omejeno število krav na robota, nujnost selekcije krav na konformacijo vimena, navajanje novih krav na robota ter tudi neoptimalno čiščenje in razkuževanje seskov z večjim številom mastitisov in večjim številom somatskih celic (Hovinen in Pyörälä, 2011; Jacobs in Siegfurd, 2012). V številnih raziskavah so ugotovili, da se število somatskih celic po preusmeritvi s sistema molže na robota poveča in da imajo kmetije z robotsko molžo več somatskih celic v mleku in več krav z visokimi vrednostmi somatskih celic kot kmetije s konvencionalno molžo. Razlogi slabšega stanja bi lahko bili molža samo z eno molzno enoto, slabše čiščenje seskov in neredna molža. Tudi število zdravljenj se je na nekaterih kmetijah povečalo, kar je morda posledica alarmov za mastitis, ki jih dobijo kmetje pri vsakodnevnem merjenju somatskih celic pri robotski molži (Hovinen in Pyörälä, 2011).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 DOVOLJENJE KOMISIJE ZA DOBROBIT

Raziskavo je odobrila Komisija za dobrobit živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani dne 25. 3. 2020.

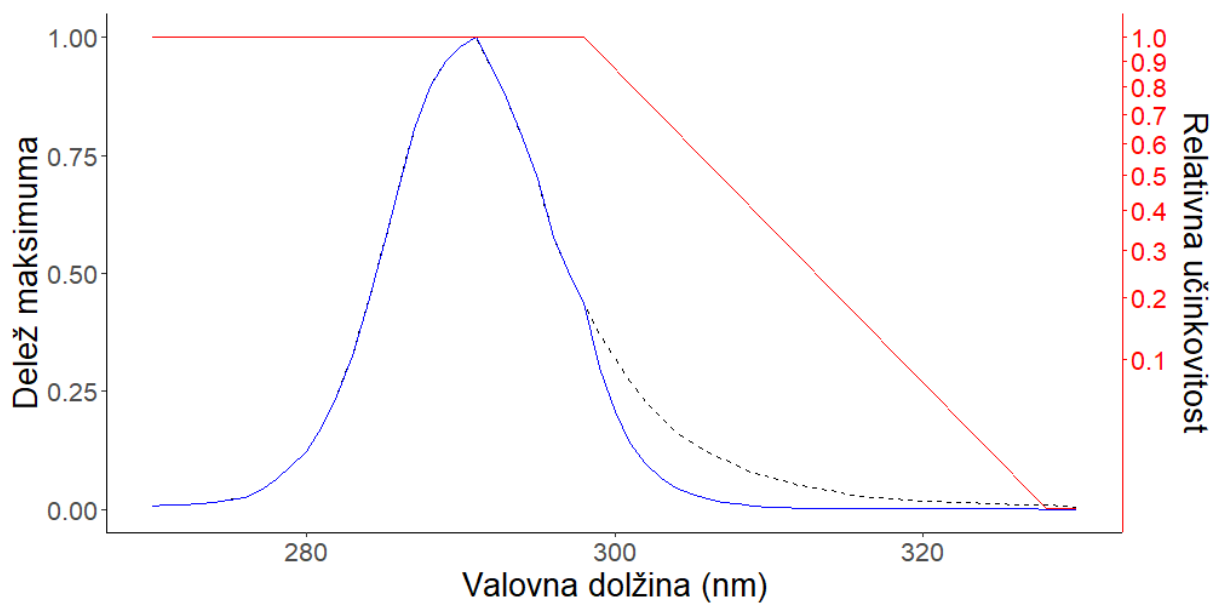
#### 3.2 DOLOČANJE MED

##### 3.2.1 Živali

V raziskavo določanja MED smo vključili 16 krav in 5 starejših telic iz dveh čred. Živali so bile črno-bele pasme. Starost govedi, vključenih v postopek, je bila med 22 meseci in 10,6 leta (mediana 3,8 leta). Vzreja živali je potekala izključno v hlevih in brez dostopa do neposrednega sončnega UV sevanja. Raziskava je potekala aprila in maja leta 2021. Živali za raziskavo smo izbirali naključno. Edini pogoj za vključitev je bila dovolj velika bela lisa na hrbtni strani medenice, ki je zagotovila dovolj veliko površino za izvedbo obsevanja. MED smo določili v hlevu, pri čemer smo kravo ulovili v jasli z možnostjo zaklepa. Živali pri tem nismo sedirali ali jih dodatno fiksirali.

##### 3.2.2. UV luč

Za določanje MED smo uporabili LED diodo ozkega valovnega spektra UV LED Houkem-SMD 3535-290-300 nm (Dongguan Houke Electronic Co., Ltd., Guang Dong, Kitajska), nameščeno na računalniški hladilnik. Za napajanje smo uporabili napetost 7 V in tok 140 mA. Moč luči je bila 3 mW/cm<sup>2</sup>. Vrh proizvedene moči je bil pri valovni dolžini 292 nm (Slika 4). Za določanje valovnega spektra luči smo uporabili spektrometer HR4000 (Ocean Optics Inc., Dunedin, Florida, ZDA). Celokupno optično moč smo izmerili z 10-W Thermal power meter S310C (Thorlabs GmbH, Bergkirchen, Nemčija). Večina (89,75 %) moči naše UV luči je bila sposobna proizvesti rdečino (preračunano na CIE krivuljo za povzročitev rdečine) (Slika 4). Luč je bila nameščena na šablono z odprtino premera 1 cm, ki je zožila kot obsevanja in je prepuščala le 55 % celokupnega sevanja (Slika 5), kar pomeni, da je kožo krave doseglo le 1,48 mW/cm<sup>2</sup> (preračunano na CIE krivuljo za povzročitev rdečine).

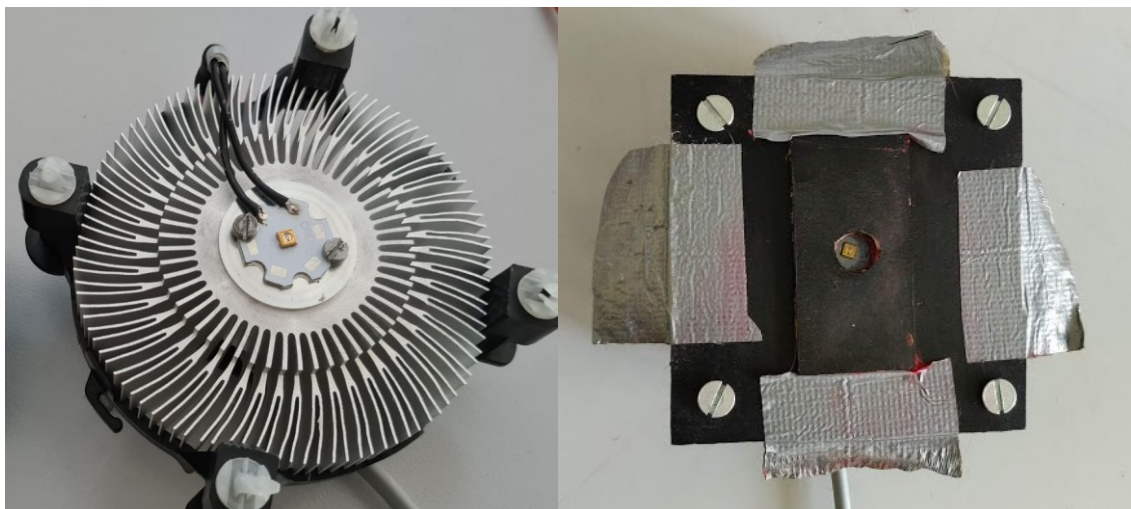


Slika 4: Moč obsevanja glede na valovno dolžino

Moč obsevanja UV luči (črtkasta krivulja), moč obsevanja, preračunana na CIE krivuljo za povzročitev rdečine (modra krivulja), in CIE krivulja (rdeča krivulja). Povzeto in prirejeno po ISO 17166 (1999).

Figure 4: The power of irradiation weighted by wavelength.

Irradiation power of the UV light (dotted curve), calculated irradiation power based on the CIE erythema graph (Blue curve) and the CIE graph (red curve). Adapted from ISO 17166 (1999).



Slika 5: UV LED luč in UV luč s šablono premera 1 cm

Figure 5: UV LED light and UV light with a 1 cm diameter template

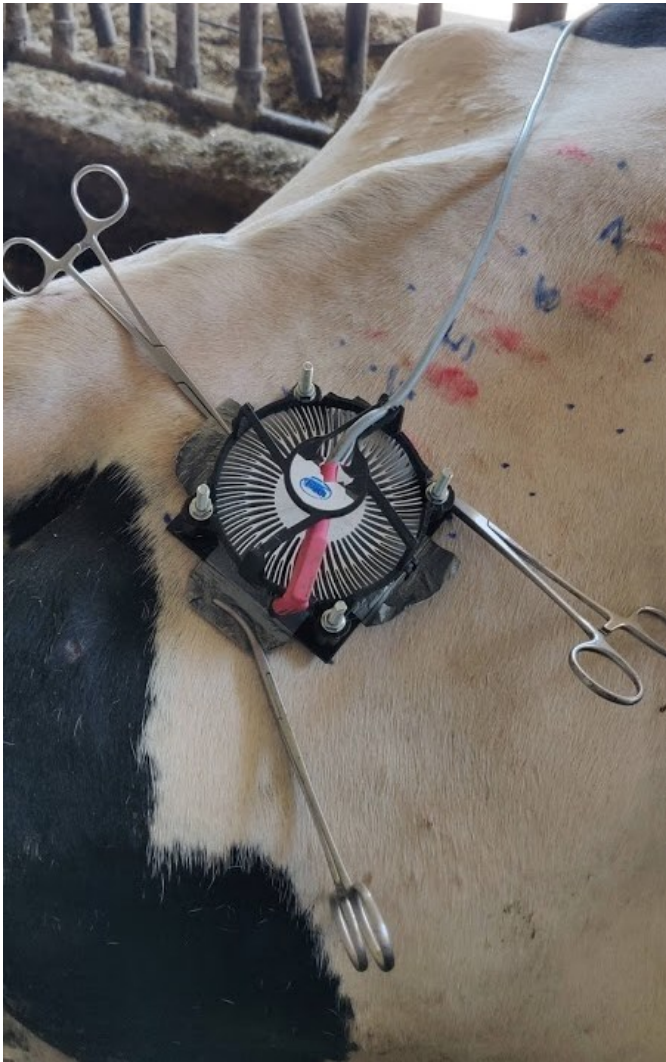
### 3.2.3 Obsevanje

Za obsevanje smo izbrali hrbtno stran medenice, ker zagotavlja relativno ravno površino za namestitev UV luči in je v naravnih pogojih med področji, ki so najbolj izpostavljena sončnemu UV sevanju. Obsevali smo le bela področja kože, ker so bolj občutljiva za UV sevanje. Krave smo obsevali na osmih odlakanih in osmih obrutih mestih, da bi ugotovili MED odlakane kože (MED-H) in MED obrite kože (MED-S). Odmerek smo stopnjevali med različnimi mesti obsevanja (Tabela 1). Pred obsevanjem smo dlako na mestu obsevanja pogladili z roko oziroma jo obrili z električnim brivnikom. Na mestu obsevanja smo tudi izpulili nekaj dlak za izmero povprečne dolžine dlake. UV luč smo na kravo namestili s prijemali Rochester-Pean (Slika 6). Rezultate obsevanja (rdečino) sta po 24 urah ocenjevala dva ista raziskovalca. Najnižji odmerek, ki je povzročil zaznavno rdečino, smo izbrali za MED (Slika 7).

Tabela 1: Protokol obsevanja za določanje MED

Table 1: Irradiation protocol for MED determination

MED-H		MED-S	
odmerek ( $J/m^2$ )	čas (s)	odmerek ( $J/m^2$ )	čas (s)
1500	101	100	7
3000	203	200	14
4000	270	300	20
5000	338	400	27
6000	405	600	41
7000	473	800	54
8000	540	1000	68
10000	675	1500	101



Slika 6: UV luč, pričvrščena na kravo s prijemalkami Rochester-Pean

Figure 6: UV lamp attached to a cow with Rochester-Pean forcepes.



Slika 7: Mesto obsevanja na obriti koži

Takoj po obsevanju (levo) in 24 ur po obsevanju (desno). Zaznavna rdečina je označena z modrimi puščicami. Pri kravi je bil tretji odmerek ( $300 \text{ J/m}^2$ ) najmanjši odmerek, ki je še povzročil rdečino, zato smo ga izbrali za MED te krave na obriti koži.

Figure 7: Irradiation area on shaven skin.

Immediately after irradiation (left) and 24 hours after irradiation (right). The detectable erythema is marked with blue arrows. In this cow the third dose ( $300 \text{ J/m}^2$ ) was the minimum dose which produced erythema; therefore, it was chosen as the MED on shaven skin for this cow.



### 3.2.4. Statistična analiza podatkov

Statistično analizo in grafe smo pripravili s statističnim programom R (R Foundation for Statistical Computing, Dunaj, Avstrija). Za oceno normalnosti porazdelitve podatkov smo uporabili Shapiro-Wilkov test, za ugotavljanje razlike v MED med kravami in telicami na obrutih in odlakanih mestih pa Wilcoxonov test vsote rangov. Razliko v dolžini dlake smo analizirali s Studentovim t-testom. Korelacijo med dolžino dlake in MED na odlakanih mestih smo ugotavljali s Spearmanovim korelacijskim koeficientom. Povezavo smo preučili tudi z modelom linearne regresije in značilnost določili pri vrednosti  $p < 0,05$ .

## 3.3 SPOSOBNOST SINTEZE VITAMINA D V KOŽI POD VPLIVOM OBSEVANJA MED ROBOTSKO MOLŽO

### 3.3.1 Živali

V postopek smo vključili 51 krav črno-bele pasme z ene kmetije. Edina pogoja za vključitev v poskus sta bila, da je krava v laktaciji in da v času preskusa ni presušena, zato smo izbrali le krave, ki še niso bile breje oziroma so bile breje manj kot 160 dni. Ob prvem vzorčenju smo vsako kravo v stoječem položaju slikali s ptičje perspektive in z analizo slike določili razmerje med črno dlako in belo dlako na področju hrbta med lopaticama in kolčnima grčama s programom ImageJ 1.52 (National Institutes of Health, ZDA). Izbrane krave smo nato z metodo stratificiranega vzorčenja razdelili naključno v tri enakovredne skupine po 17 živali na podlagi mlečnosti v prejšnji standardni laktaciji oziroma glede na povprečno življenjsko mlečnost mater v primeru prvesnic, razmerje med črno in belo dlako na hrbtu ( $< 50\%$  /  $> 50\%$ ) in čas po telitvi ( $< 30$  dni /  $> 30$  dni). Med potekom raziskave smo izločili štiri krave, eno v skupini krav, ki smo jih brili, in tri v skupini krav, ki jih nismo brili. V kontrolni skupini so bile ves čas postopkov v raziskavo vključene vse krave.

### 3.3.2 Analiza krme

Krave so bile krmljene s krmno mešanico (enolončnico) s sestavo, ki jo prikazujemo v Tabeli 2. Poleg obroka na krmilni mizi so krave v molznem robotu prejele tudi močna krmila, in sicer vsaka krava 0,5 kg krmila K-22 (Jata Emona d. o. o., Ljubljana, Slovenija) ter za vsakih 10 kg mleka nad 20 kg dnevne prireje 1 kg K-TOP (Jata Emona d. o. o., Ljubljana, Slovenija) in 1 kg K-TOP-50 (Jata Emona d. o. o., Ljubljana, Slovenija). Sestavo krmil prikazujemo v Tabeli 3. Krmo smo odvzeli ob prvem, tretjem in četrtem vzorčenju po metodi, opisani v Uredbi komisije (ES) 152/2009. Vzorce smo odvzeli s krmilne mize. Krma je bila analizirana po Uredbi komisije

(ES) 152/2009 na Inštitutu za varno hrano, krmo in okolje Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani, kjer so izvedli Weendsko analizo. Dodatno smo vzorce poslali tudi v laboratorij Chelab (Italija), kjer so določili vsebnost vitamina D<sub>3</sub> z metodo visokozmogljive tekočinske kromatografije, sklopljene z masno spektrometrijo (HPLC/MS).

Tabela 2: Sestava krmne mešanice (enolončnice), ki so jo dnevno pokladali na kravo v dveh obrokih

Table 2: Composition of total mixed ration fed daily per cow in two meals

Sestavina	Masa (kg)
pšenična slama	0,5
koruzna silaža	20
travna silaža	26
koruza	0,8
sojine tropine	0,3
repične tropine	0,3
maščoba v prahu	0,1
pivske tropine	1
K-mix-PASS*	0,8
Rumisal-10*	0,15
apnenec	0,08
soda bikarbona	0,150
Complett EXTRA-Keragen® <sup>+</sup>	0,1
Skupna masa	50,280

Opomba: \*Proizvajalec Jata Emona d.o.o., Ljubljana, Slovenija; <sup>+</sup>Proizvajalec Josera d.o.o., Ljubljana, Slovenija.

Comment: \*Manufacturer Jata Emona d.o.o., Ljubljana, Slovenia; <sup>+</sup>Manufacturer Josera d.o.o., Ljubljana, Slovenia

Tabela 3: Sestava močnih krmil po hranilnih snoveh

Table 3: Nutritional composition of concentrated feeds

Sestava	K-22*	K-TOP*	K-TOP-50*
surove beljakovine (%)	22	10	21
surove maščobe (%)	2,2	7,2	5,4
surova vlaknina (%)	7,8	5,1	6,4
surovi pepel (%)	6,6	6,5	7,9
kalcijs (%)	0,85	1,2	1,2
fosfor (%)	0,65	0,4	0,7
natrij (%)	0,25	0,5	0,3
magnezij (%)	0,3	0,4	0,5
vitamin D <sub>3</sub> (IE/kg)	1000	0	1000

Opomba: \*Proizvajalec Jata Emona d. o. o., Slovenija.

Comment: \*Manufacturer Jata Emona d. o. o., Slovenia

### 3.3.3 UV luč

Za obsevanje krav v času robotske molže smo uporabljali UV luč, ki smo jo izdelali sami. Luč je sestavljalo 90 UV LED diod Houkem-SMD 3535-290-300 nm (Dongguan Houke Electronic Co., Ltd., GuangDong, Kitajska), nameščenih na ukrivljeno aluminijasto ogrodje (širina 40 cm, dolžina 120 cm), sestavljeno iz šestih rešetk. Na vsako rešetko je bilo nameščenih 15 LED diod, ki so bile vezane v skupine s po tremi zaporedno vezanimi LED diodami (Slika 8). Skupna moč naprave je bila 295,2 mW, moč UV luči pa je bila največja pri valovni dolžini 295 nm. Za določanje valovnega spektra in moči luči smo uporabili spektrometer HR2000+ (Ocean Optics Inc., Dunedin, FL, ZDA).

### 3.3.4 Obsevanje

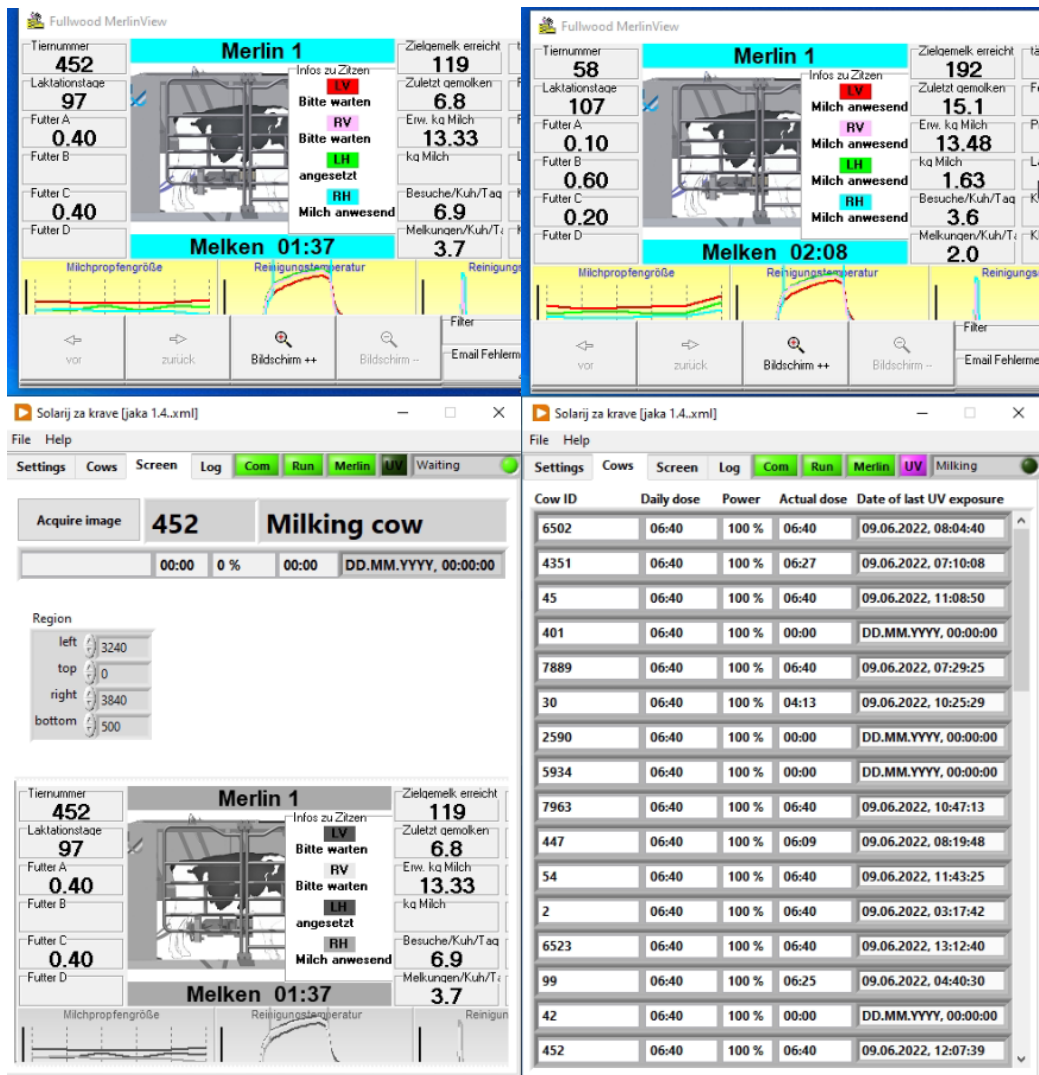
Kravam, razdeljenim v tri enakovredne skupine, smo določili tri različne protokole obsevanja v času robotske molže na molznem robotu Merlin 225 (Fullwood Packo, Ellesmere, Združeno Kraljestvo). Krave smo obsevali le po hrbtu, da smo se izognili glavnim mestom nastanka SCC (očem in vulvi) in da smo zaščitili na UV sevanje občutljive komponente molznega robota. Krave v prvi skupini so bile obrite in dnevno obsevane z 80 J/m<sup>2</sup>, krave v drugi skupini pa so bile odlakane in obsevane z odmerkom, ki je bil odvisen od časa robotske molže in dnevno ni presegal 360 J/m<sup>2</sup>. Za takšen protokol obsevanja smo se odločili zaradi omejene moči luči.

Krave v tretji skupini so služile kot kontrolna skupina in niso bile obsevane. Dnevni odmerek smo zagotovili s programom Fullwood MerlinView (Fullwood Packo, Ellesmere, Združeno kraljestvo) in s programom LabVIEW: Advanced programming technique (National Instruments, Austin, Texas, ZDA). Program MerlinView je prepoznal vsako kravo preko digitalnega transponderja, ki so ga krave nosile na sprednji desni nogi, in v realnem času sporočal, kaj se trenutno dogaja s kravo v robotu. S programom LabVIEW smo zajemali posnetke zaslona programa MerlinView in ob začetku molže sprogramirali vklop luči. Program je beležil tudi čas obsevanja, s čimer smo lahko omejili dnevni odmerek obsevanja na kravo za vsako skupino (Slika 9). Obsevanje je potekalo dva meseca, od 25. 3. 2022 do 24. 5. 2022.



Slika 8: Obsevanje krave z UV LED lučjo, nameščeno v molznega robota Fullwood Merlin 225

Figure 8: Irradiation of a cow with the UV LED light mounted into the milking robot Fullwood Merlin 225



Slika 9: Programa Fullwood MerlinView in LabVIEW

Program Fullwood MerlinView in (zgoraj levo in desno) in program LabVIEW za beleženje slike zaslona (levo spodaj) in vodenje evidence obsevanja na dan (desno spodaj).

Figure 9: Programs Fullwood MerlinView and LabVIEW

Program Fullwood MerlinView (top right and left) and program LabVIEW capturing the screen (bottom left) and recording the daily irradiation (bottom right).

### 3.3.5 Vzorčenje

Med raziskavo smo štirikrat opravili vzorčenje krvi – prvič 14. 3. (–11 dni), drugič 1. 4. (+7 dni), tretjič 25. 4. (+30 dni) in zadnjič 24. 5. (+60 dni). Pri prvem vzorčenju smo kravam odvzeli vzorec krvi iz repne vene (*lat. v. caudalis mediana*) v epruveto z antikoagulantom EDTA in v epruveto brez dodatka za pridobitev seruma (BD Vacutainer®, Franklin Lakes, New Jersey, ZDA). Po odvzemu smo kri čim hitreje transportirali v laboratorij (v eni uri). Hemogramsko preiskavo smo opravili še istega dne. Vzorce serumske krvi smo pustili v hladilniku preko noči, da se je lahko izločil serum. Naslednji dan smo vzorce dvakrat centrifugirali (10 minut pri 3000 obratih na minuto), serum razdelili na tri enake dele in ga zamrznili na –20 °C do laboratorijskih analiz. Krave smo slikali za oceno razmerja med črno in belo barvo na področju hrbta med lopaticama in kolčnima grčama s ptičje perspektive. Izpulili smo tudi nekaj dlak (vsaj 10) z mesta obsevanja (prečni podaljški ledvenih vretenc) za določitev povprečne dolžine dlake na hrbtu. Za določitev dolžine dlake smo izmerili dolžino treh naključno izbranih dlak in uporabili povprečje. Vsem kravam smo izmerili višino v vihru in ocenili telesno kondicijo po lestvici Body Condition Score (BCS) z ocenami 1–5 po metodi Univerze Pennsylvania State, ZDA. Pri nadaljnjih vzorčenjih smo odvzeli le vzorce krvi in ocenili telesno kondicijo. Pri zadnjem vzorčenju smo kravam v odlakani skupini ponovno odvzeli vzorec dlake po opisani metodi. Med celotno raziskavo je molzni robot spremljal količino namolzenega mleka na molžo. Zbrali smo tudi podatke o proizvodnji mleka iz vsakomesečnih mlečnih kontrol, ki so sovpadale s časom raziskave (11. 3. 2022, 8. 4. 2022, 13. 5. 2022).

### 3.3.6 Analiza krvi

V vsakemu vzorcu krvi smo določili vrednosti hemograma (število belih krvnih celic, število rdečih krvnih celic, hemoglobin, hematokrit, povprečno prostornino eritrocitov, povprečno količino hemoglobina v eritrocitih, povprečno koncentracijo hemoglobina v eritrocitih, število trombocitov) z napravo Vet abc Plus™ (Scil animal care company GmbH, Viernheim, Nemčija). Diferencialno belo krvno sliko smo določili s štetjem celic v krvnem razmazu na imerzijskem mikroskopu po predhodnem barvanju po metodi Hemacolor® (Merck KGaA, Dramstadt, Nemčija). Vzorce smo po navodilih proizvajalca analizirali tudi za biokemijske parametre (glutamat dehidrogenazo – GLDH [kataloška številka: GL 441], gama glutamil transferazo – GGT [kataloška številka: GT8320], albumine [kataloška številka: AB8000], proteine [kataloška številka: TP3869], kalcij [kataloška številka: CA3871], fosfor [kataloška številka: PH3872] RX Daytona+ (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, Združeno kraljestvo)) na

napravi RX Daytona+ (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, Združeno kraljestvo). Vrednosti 25(OH)D smo izmerili na napravi miniVIDAS (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, Francija) po metodi imunskega testa ELFA (*angl.* Enzyme Linked Fluorescent Assay). Uporabili smo reagentni komplet VIDAS<sup>®</sup> 25 OH Vitamin D Total [kataloška številka: 30463] (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, Francija). Pri tej metodi vzorec zmešamo z reagentom, ki loči 25(OH)D od vitamin D vezočega proteina. Zmes nato s pomočjo receptala trde faze prenesemo v posodico s protitelesi za vitamin D, ki so označeni z alkalno fosfatazo. 25(OH)D v vzorcu tekmuje z 25(OH)D na receptalu trde faze za mesta na protitelesih. V zadnjem koraku receptal trde faze spiramo s substratom (4-metillumbeliferil fosfat). Alkalna fosfataza na protitelesih anti-25(OH)D katalizira hidrolizo substrata v fluorescirajoči produkt (4-metilumbeliferon). Njegovo fluorescenco merimo pri valovni dolžini 450 nm. Intenzivnost fluorescence je obratno sorazmerna s koncentracijo 25(OH)D v vzorcu. Naprava nato sama preračuna koncentracijo 25(OH)D v vzorcu (Moreau in sod., 2016).

### 3.3.7 Statistična analiza podatkov

Statistično analizo in grafe smo pripravili s statističnim programom R (R Foundation for Statistical Computing, Avstrija). Za oceno normalnosti porazdelitve podatkov smo uporabili Shapiro-Wilkov test, za primerjavo vrednosti parametrov med skupinami pa test analize varianc (ANOVA) oz. njegov neparametrični ekvivalent Kruskal-Wallisov test. Za analizo razlik med posameznimi skupinami smo uporabili Tukeyjev HSD pristop oz. Wilcoxonov test vsote rangov z Bonferronijevim popravkom p-vrednosti. Za analizo razlik med vzorčenji smo uporabili test ANOVA ponovljene meritve oz. Friedmanov test pri nenormalno porazdeljenih podatkih. Za analizo korelacij smo uporabili metodo po Pearsonu oz. Spearmanu s korekcijo p-vrednosti po Holmu. Za analizo odvisnosti proizvodnje vitamina D od deleža črnosti kože na hrbtu smo uporabili linearno regresijo. Značilnost smo določili pri vrednosti  $p < 0,05$ .

## 3.4 VPLIV DLAKE IN BARVE DLAKE OZ. KOŽE NA SINTEZO VITAMINA D V KOŽI

### 3.4.1 Merjenje deleža črne obarvanosti

Za analizo tretje hipoteze smo morali določiti razmerje med črno in belo dlako na področju hrbta. Ob prvem vzorčenju smo vsaki kravi fotografirali hrbet s ptičje perspektive. Slike smo nato analizirali s programom Image J 1.52 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, ZDA). Najprej smo slike pretvorili v črno-beli format, nato pa smo na sliki omejili željeno polje preiskave (področje hrbta med lopaticama in kolčnima grčama) in izmerili njegovo površino. S

funkcijo Analyse particles smo nato izmerili površino črnih lis. Nazadnje smo površino črnih lis delili s površino preiskovanega dela hrbta in dobili delež črne obarvanosti na hrbtu.

#### 3.4.2 Preostali materiali in metode za preiskavo tretje hipoteze

ostale materiale in metode, uporabljene za preverjanje tretje hipoteze, opisujemo v točkah 3.3.1–3.3.7.



## 4 REZULTATI

### 4.1 DOLOČANJE MED

Nobena žival med obsevanjem in po njem ni kazala znakov nelagodja (gledanje proti mestu obsevanja, brcanje, praskanje, upiranje, odmikanje ipd.). Rezultate obsevanja predstavljamo v Tabeli 4. Rdečina je izginila v nekaj dneh. Povprečna vrednost MED  $\pm$  SEM na odlakanih mestih je bila  $5595 \pm 380 \text{ J/m}^2$ , na obrutih mestih pa  $329 \pm 14 \text{ J/m}^2$ . Telice so imele na odlakanih mestih višji MED ( $7600 \text{ J/m}^2$ ) kot krave ( $4969 \text{ J/m}^2$ ) ( $p = 0,004$ ). Telice so imele tudi daljšo dlako ( $\bar{x} \pm \text{SEM } 20,2 \pm 0,8 \text{ mm}$ ) kot krave ( $\bar{x} \pm \text{SEM } 11,2 \pm 1,8 \text{ mm}$ ) ( $p = 0,001$ ). Razlika na obrutih mestih ni bila značilna ( $p = 0,053$ ). Količina UV sevanja, ki je prodrla skozi dlako, je bila odvisna od dolžine dlake. V povprečju je dlaka prepustila 6,7 % UV sevanja (prepustnost = MED na obruti koži ( $\text{J/m}^2$ )/MED na odlakani koži ( $\text{J/m}^2$ )). Spearmanov korelacijski koeficient med dolžino dlake in MED na odlakanih mestih je bil 0,76 ( $p = 0,00006$ ). Model linearne regresije je razložil 80 % variabilnosti povezave med dolžino dlake in MED na odlakanih mestih ( $p = 3,4 \cdot 10^{-8}$ ). Za vsak milimeter dolžine dlake se je MED na odlakanih mestih povečal za  $316 \text{ J/m}^2$  (MED na odlakani koži ( $\text{J/m}^2$ ) =  $1350 + 316 \times \text{dolžina dlake (mm)}$ ) (Slika 10).

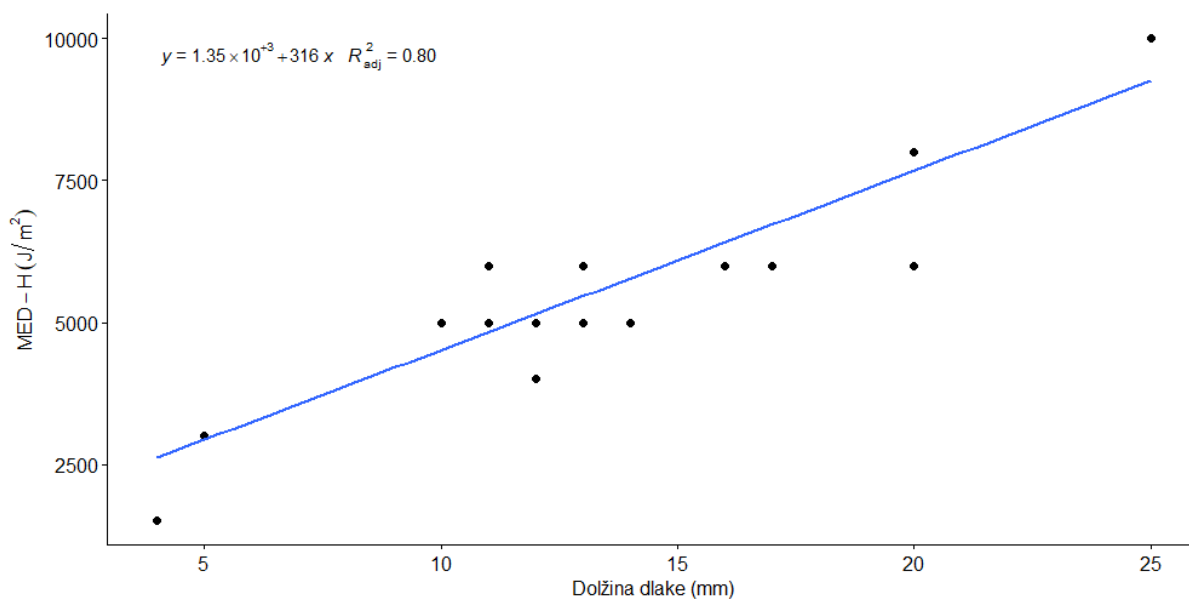
Tabela 4: Rezultati določanja minimalnega odmerka za povzročitev rdečine (MED)

Table 4: Results of minimal erythema dose (MED) determination

	Starost (leta)	MED-H (J/m <sup>2</sup> )	MED-S (J/m <sup>2</sup> )	UV dlake (%)	prepustnost Dolžina dlake (mm)
Krave	5,3	5000	300	6	11
	10,7	6000	300	6,7	17
	6,5	3000	300	10	5
	3,8	5000	400	8	12
	4,3	4000	200	5	12
	3,9	6000	400	6,7	11
	5,7	5000	400	8	10
	5,0	5000	400	8	14
	2,8	6000	400	6,7	13
	7,9	5000	400	8	10
	3,7	6000	400	6,7	13
	2,8	5000	300	6	13
	4,9	6000	300	5	13
	8,5	≤1500	300	20	4
	2,7	6000	400	6,7	11
2,5	5000	300	6	12	
Povprečje krav	5,0	4969	344	7,6	11,3
Telice	1,8	8000	200	2,5	20
	2,1	6000	300	5	16
	1,8	8000	300	3,8	20
	2,0	6000	300	5	20
	2,3	10000	300	3	25
Povprečje telic	2,0	7600	280	3,85	20,2
Povprečje skupno	4,3	5595	329	6,7	13,4

MED-S – minimalni odmerek za povzročitev rdečine na obriti koži, MED-H – minimalni odmerek za povzročitev rdečine na odlakani koži.

MED-S – Minimal erythema dose for shaven skin, MED-H – Minimal erythema dose for haired skin.



Slika 10: Model linearne regresije odvisnosti med dolžino dlake in minimalnim odmerkom za povzročitev rdečine na odlakani koži (MED-H)

Slika ponazarja linearno odvisnost dolžine dlake in minimalnega odmerka za povzročitev rdečine na odlakani koži. Črne pike so posamezne krave, modra črta pa trend. Z modelom lahko pojasnimo 80 % variabilnosti ( $R^2 = 0,8$ ).

Figure 10: Linear regression model of the correlation of hair length and minimal erythema dose of haired skin (MED-H)

The figure shows the linear relationship between hair length and minimal erythema dose of haired skin. The black dots are individual cows and the blue line the trend. The model explains 80 % of the variability ( $R^2=0,8$ ).

## 4.2 SPOSOBNOST SINTEZE VITAMINA D V KOŽI POD VPLIVOM OBSEVANJA MED ROBOTSKO MOLŽO

### 4.2.1 Skupine

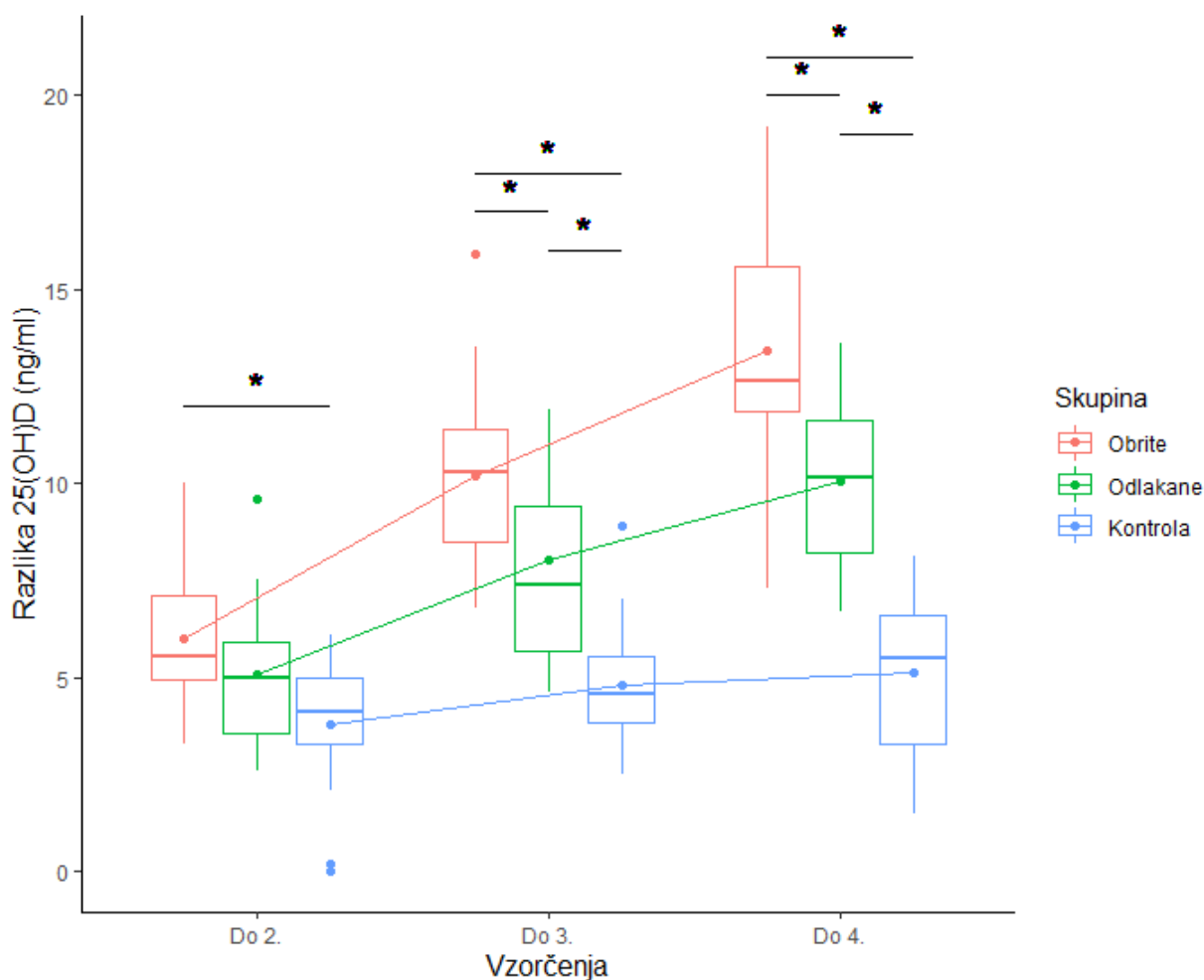
Skupine so bile pri prvem vzorčenju izenačene (Tabela 5), nekoliko so odstopale le vrednosti vitamina D pri kontrolni skupini, a razlika ni bila značilna. Krave v odlakani skupini so se v povprečju molzle 17 minut in 33 sekund na dan. Med raziskavo pri nobeni kravi nismo opazili neželenih učinkov obsevanja z UV lučjo.

Tabela 5: Primerjava skupin pri prvem vzorčenju z enosmerno ANOVO ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) in p-vrednostmiTable 5: Comparison of groups at first sampling with a one-way ANOVA ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) with p - values

	Obrite	Odlakane	Kontrola	p-vrednost
Dnevi po telitvi	1178 $\pm$ 24	160 $\pm$ 31	153 $\pm$ 24	0,98
Mleko (kg)	30,3 $\pm$ 1,5	29,9 $\pm$ 2,1	28,2 $\pm$ 2,1	0,84
Višina vihra (cm)	142,5 $\pm$ 0,9	141,4 $\pm$ 1,2	142,1 $\pm$ 1	0,74
Telesna kondicija	2,9 $\pm$ 0,1	2,9 $\pm$ 0,11	2,9 $\pm$ 0,1	0,92
% črne obarvanosti	59, $\pm$ 8,7	51,7 $\pm$ 9,5	55,5 $\pm$ 8,5	0,71
25(OH)D (ng/mL)	10,8 $\pm$ 0,5	11,6 $\pm$ 0,7	13,2 $\pm$ 0,8	0,07

#### 4.2.2 Vitamin D

V raziskavi smo ugotovili značilne razlike v proizvedenem vitaminu D med testnimi skupinami (Slika 11). Krave, ki so bile obrite in obsevane s četrtino odmerka, potrebnega za povzročitev rdečine, določenega v prvem delu raziskave, so v času raziskave (60 dni) proizvedle največ vitamina D (13,44 ng/mL 25(OH)D). Sledile so krave, ki so bile odlakane in so prejele poljubni odmerek sevanja, v povprečju 210 J/m<sup>2</sup> (10,6 ng/mL 25(OH)D). V kontrolni skupini se je 25(OH)D povečal zgolj za 5,1 ng/mL 25(OH)D. Poglavitno povečanje koncentracije vitamina D v kontrolni skupini se je zgodilo med prvim in drugim vzorčenjem, v nadaljnjih vzorčenjih pa koncentracija ni značilno porastla. Razlike med skupinami so bile značilne (Tabela 6), v obriti skupini pa je le ena krava presegla mejo zadovoljive koncentracije 30 ng/mL 25(OH)D v krvi. Večina krav (22/30) v obsevanih skupinah je presegla mejo pomanjkanja (20 ng/mL 25(OH)D).



Slika 11: Razlika med koncentracijo 25-hidroksivitamina D (25(OH)D) pri 1. vzorčenju in koncentracijo pri 2., 3. in 4. vzorčenju po skupinah

Slika ponazarja razliko v proizvedenem 25-hidroksivitamina D (25(OH)D) med prvim vzorčenjem in nadaljnjimi vzorčenji. Skupine: obrita (oranžna), odlakana (zelena) in kontrolna (modra). Obrita skupina je proizvedla največ 25(OH)D. Razlika med obrito in kontrolno skupino je bila značilna že pri drugem vzorčenju. Po tretjem vzorčenju so bile vse skupine značilno različne.

Figure 11: Difference in 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) concentration at 1<sup>st</sup> sampling and the concentration at 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup> sampling in different group.

The figure shows the difference in the synthesised 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) between the first and all the other samplings. The groups: shaven (orange), haired (green) and control (blue). The shaven group produced the most 25(OH)D. The difference between the shaven and control groups was significant at second sampling. After the third sampling all the groups were significantly different from each other.

Tabela 6: Opisna statistika celokupnega 25-hidroksivitamina D (25(OH)D) po skupinah in vzorčenjih ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )Table 6: Descriptive statistics of total 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) by group and sampling ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ).

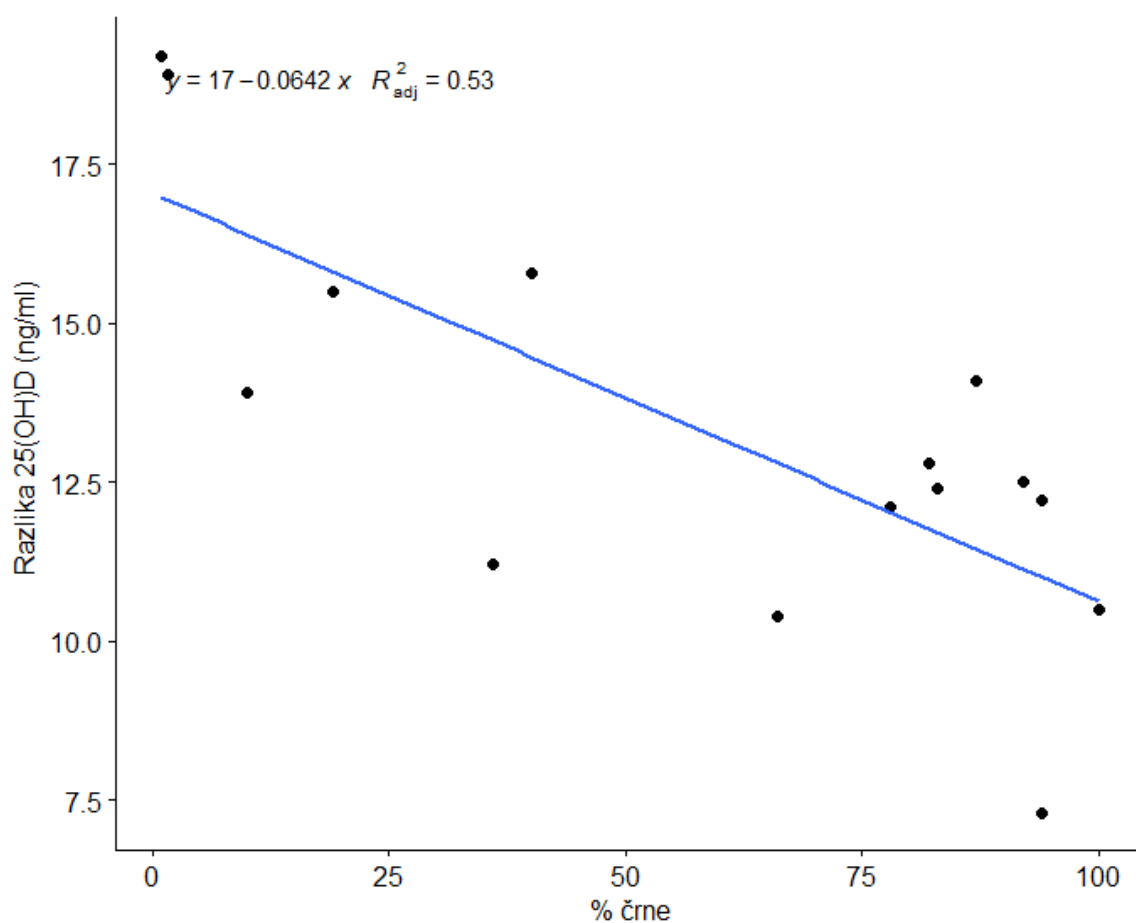
25(OH)D (ng/mL)	Obrite	Odlakane	Kontrola
0 dni	10,79 $\pm$ 0,52 <sup>a,1</sup>	11,58 $\pm$ 0,67 <sup>a,1</sup>	13,15 $\pm$ 0,8 <sup>a,1</sup>
7 dni	16,61 $\pm$ 0,56 <sup>b,1</sup>	16,36 $\pm$ 0,95 <sup>b,1</sup>	16,96 $\pm$ 0,76 <sup>b,1</sup>
30 dni	20,74 $\pm$ 0,66 <sup>c,1</sup>	19,36 $\pm$ 0,87 <sup>b,1</sup>	17,75 $\pm$ 0,82 <sup>b,2</sup>
60 dni	24,16 $\pm$ 0,85 <sup>d,1</sup>	21,54 $\pm$ 0,76 <sup>c,2</sup>	18,26 $\pm$ 0,72 <sup>b,3</sup>

Opomba: Črke in številke ponazarjajo značilno razliko. Različne črke ponazarjajo značilne razlike med vrsticami, različne številke pa značilne razlike med stolpci.

Comment: Letters and numbers indicate significant differences. Different letters indicate the significant differences between rows. Different numbers indicate the significant differences between columns.

#### 4.3 VPLIV DLAKE IN BARVE DLAKE OZ. KOŽE NA SINTEZO VITAMINA D V KOŽI

Pri obriti skupini je bila proizvodnja vitamina D med prvim vzorčenjem in četrtem vzorčenjem negativno povezana s površino črne obarvanosti kože (vitamin D (ng/mL) = 17 – 0,0642 x delež črne kože (%)) (Spearmanov rho = –0,64; p = 0,03) (Slika 12). Enake korelacije nismo ugotovili pri odlakani skupini (Spearmanov rho = 0,084; p = 0,78). Ugotovili smo tudi, da dlaka vpliva na sintezo vitamina D v koži, saj so krave v obriti skupini v času raziskave proizvedle značilno več vitamina D kljub nižjemu dnevemu odmerku obsevanja (p = 0,002) (Slika 11).



Slika 12: Odvisnost razlike v koncentraciji 25-hidroksivitamina D (25(OH)D) med 1. in 4. vzorčenjem ter deležem črne kože na mestu obsevanja

Slika ponazarja linearno odvisnost razlike v koncentraciji 25-hidroksivitamina D (25(OH)D) med prvim in četrtem vzorčenjem ter deležem črne kože na mestu obsevanja. Črne pike predstavljajo posamezne krave, modra črta pa trend. Z modelom lahko pojasnimo 53 % variabilnosti ( $R^2 = 0,53$ ).

Figure 12: Correlation of the difference in 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) concentration between 1<sup>st</sup> and 4<sup>th</sup> sampling and percent of black skin at the irradiation area

The figure shows the linear correlation of the difference in 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) concentration between 1<sup>st</sup> and 4<sup>th</sup> sampling and percent of black skin at the irradiation area. The black dots represent individual cows and the blue line the trend. The model explains 53 % of the variability ( $R^2=0,53$ ).

#### 4.3.1 Hemogram in biokemija

Pri krvnih parametrih nismo ugotovili značilnih razlik med skupinami, ki bi jih lahko povezali z UV obsevanjem. Tudi nihanja med vzorčenji so bila podobna med skupinami in jih ne moramo prepisati obsevanju. Tabele z opisno statistiko posameznih krvnih in biokemijskih parametrov so v prilogi. Pri nekaterih kravah so vrednosti pri nekaj vzorčenjih pri posameznih vrednostih odstopale od referenčnih vrednosti.

#### 4.3.2 Ocena kondicije

Pri oceni kondicije med skupinami ali med vzorčenji nismo opazili značilnih razlik (Tabela 7).

Tabela 7: Opisna statistika ocene telesne kondicije ter p-vrednosti razlik med skupinami in med vzorčenji pri posamezni skupini

Table 7: Descriptive statistics of body condition scoring and p-values of the differences between groups and samplings within groups

	Obrite	Odlakane	Kontrola	p-vrednost
0 dni	2,9 ± 0,1	2,9 ± 0,1	2,9 ± 0,1	1
7 dni	2,9 ± 0,1	2,7 ± 0,1	2,7 ± 0,1	1
30 dni	2,8 ± 0,1	2,7 ± 0,1	2,6 ± 0,1	1
60 dni	2,9 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,7 ± 0,1	0,48
p-vrednost	0,61	0,59	0,2	

#### 4.3.3 Dolžina dlake

V odlakani skupini se je dlaka v času raziskave v povprečju skrajšala za  $8,4 \pm 1,2$  milimetra (Tabela 8) in je bila značilno različno dolga v primerjavi z dlako na začetku poskusa ( $p = 0,000014$ ).



Tabela 8: Sprememba dolžine dlake v odlakani skupini

Table 8: Change in hair length in the haired group

Krava	Dolžina dlake – 1. vzorčenje (mm)	Dolžina dlake – 4. vzorčenje (mm)	Razlika
A	17	10	7
B	22	9	13
C	23	19	4
D	11	12	-1
E	26	11	15
F	21	14	7
G	18	11	7
H	16	6	10
I	20	15	5
J	21	8	13
K	22	10	12
L	23	9	14
M	16	12	4
N	28	21	7
Povprečje	20,3	12	8,4

#### 4.3.4. Prireja mleka

Prireja mleka na podlagi mlečnih kontrol se med skupinami ni značilno razlikovala. Ko smo primerjali podatke, zbrane s strani molznega robota, smo ugotovili značilne razlike. Povprečna prireja na dan se je med skupinami razlikovala ( $p = 2,961 \times 10^{-10}$ ). Odlakana skupina in obrita skupina sta proizvedli značilno več mleka kot kontrolna skupina ( $p = 1,2 \times 10^{-6}$  oz.  $p = 1,6 \times 10^{-9}$ ) (Tabela 9). Razlika med obrito in odlakano skupino ni bila značilna ( $p = 0,79$ ). Količina proizvedenega mleka je bila odvisna od časa in od skupine ( $p < 0,000$ ); ko smo podatke razdelili po skupinah, smo značilno povezavo ( $p=0,0024$ ) ugotovili le pri kontrolni skupini, v kateri se je prireja mleka zmanjševala skozi celotni čas raziskave (Slika 13).

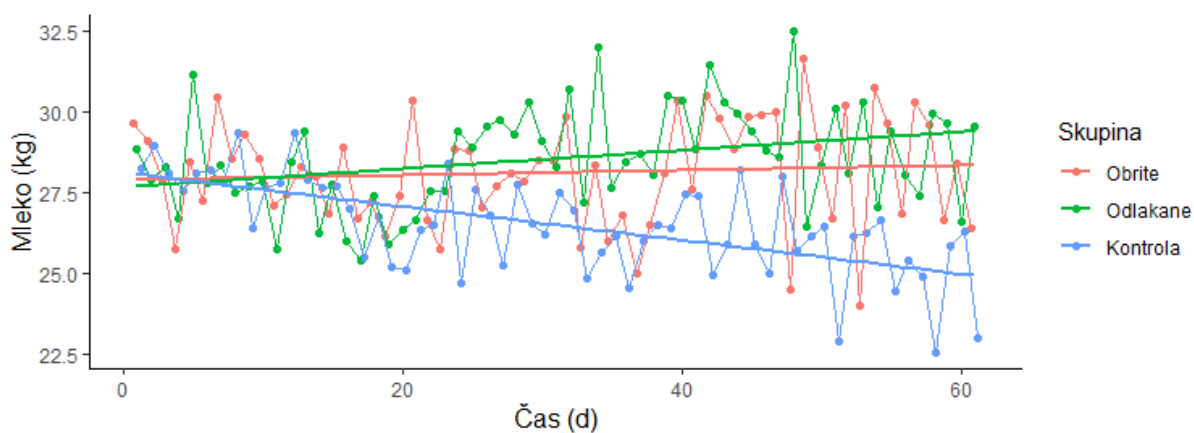
Tabela 9: Prireja mleka po skupinah

Table 9: Milk yield by group

Mleko (kg)	Obrita	Odlakana	Kontrola
Kontrola 11. 3. 2022	26,5	28,6	28,3
Kontrola 8. 4. 2022	26,9	27,6	28
Kontrola 13. 5. 2022	28	29,9	26,7
Povprečna prireja na dan*	28,7 ± 2,7	29,4 ± 2,1	26,5 ± 1,8

Opomba: \*Podatki iz molznega robota.

Comment: \* Data from the milking robot



Slika 13: Prirreja mleka v odvisnosti od časa pri kravah, vključenih v raziskavo

Slika ponazarja povprečno prirrejo mleka po skupinah (obrita (oranžna), odlakana (zelena) in kontrolna (modra)) na dan raziskave (0–60 dni). Podatke o prirreji je spremljal molzni robot. Obrita in odlakana skupina sta proizvajali značilno več mleka proti koncu raziskave. Pri kontrolni skupini se je proizvodnja mleka s časom raziskave zmanjševala.

Figure 13: Milk yield in relation to time in cows enrolled in the study

The figure shows the average daily milk yield per group (shaven (orange), haired (green), control (blue)) during the study (0-60 days). The milk yield data was recorded by the milking robot. The shaven and haired groups produced significantly more milk towards the end of the study. The milk yield in the control group was dropping as the study went on.

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 DOLOČANJE MED

Vrednost MED pri govedu je slabo raziskana. V literaturi obstaja le ena raziskava, v kateri so določili vrednost MED goveda pri  $100 \text{ J/m}^2$ , a podatki o valovnih dolžinah UV svetlobe, ki so jo uporabili pri poskusu, niso natančno opisali (Mehlhorn in Steiger, 1975). V naši raziskavi smo ugotovili, da je vrednost MED bele kože pri kravah črno-bele pasme višja od odmerka  $100 \text{ J/m}^2$ , ki ga kot MED krav navajajo v literaturi. V raziskavi, ki sta jo opravila Mehlhorn in Steiger, tudi ni navedeno, kakšno UV obtežitev za povzročitev rdečine sta uporabila. V naši raziskavi smo uporabili UV LED luč ozkega spektra z vrhom obsevalne moči pri 292 nm. MED smo izračunali z uporabo obtežitve za povzročitev rdečine, ki je bila sprejeta s strani Mednarodne komisije za osvetlitev (CIE) za ljudi. Vrednosti MED na obriti in odlakani beli koži, ki smo ju ugotovili, se ujemata tudi s podatki drugih raziskav, v katerih so uporabili odmerek  $176 \text{ J/m}^2$  (Morrow in sod., 2001) na obriti koži in odmerek  $2400 \text{ J/m}^2$  (Jakobsen in sod., 2015; Hymøller in sod., 2017) na odlakani koži, pri čemer niso ugotovili rdečine obsevane kože pri kravah. V našem poskusu je bila le ena krava z dlako dolžine 4 milimetre, ki je imela vrednost MED na odlakani koži nižjo od  $1500 \text{ J/m}^2$  in bi lahko proizvedla rdečino na odlakani koži pri obsevanju z odmerkom iz omenjenih raziskav.

Odmerek sončnega sevanja, ki ga prejmemo na zemljini površini, je odvisen od geografske širine, letnega časa, ure v dnevu, nadmorske višine, oblačnosti, onesnaženja zraka in debeline ozonskega plašča (Lerche in sod., 2017). Ugotovljeni odmerki za povzročitev rdečine v naši raziskavi so lahko poleti na geografski širini Slovenije preseženi ( $4900\text{--}6120 \text{ J/m}^2$ ) (Reuder in Koepke, 2005; Rieder in sod., 2008; Bilbao in de Migue, 2020). To še dodatno potrjuje priporočilo, da morajo imeti živali na pašniku senco, kamor se lahko umaknejo pred sončnim sevanjem, sicer lahko pride do sončnih opeklin. Slednjim so dodatno podvrženi obrita koža in mesta s slabšim odlakanjem, kot so smrček, vime, vulva in koža okoli oči. Odmerek  $300 \text{ J/m}^2$  je presežen v pol ure pri UV indeksu 6. Dejstvo je, da smo v naši raziskavi MED določali pri kravah, ki so bile celo življenje rejene v hlevih brez stika z neposrednim sončnim UV sevanjem, kar pomeni, da so bile brez kakršne koli zaščitne prilagoditve na UV sevanje. Ker krave, ki se pasejo, začnejo pašo spomladi, ko UV sevanje še ni tako močno, se lahko koža postopno zadebeli in s tem krave zaščiti pred višjimi odmerki UV sevanja in opeklinami. Čez dan krave tudi spreminjajo svoj položaj glede na sonce, kar pomeni, da celokupnemu dnevnemu sončnemu UV odmerku ne izpostavljajo zgolj ene površine.

Vrednost MED, ki smo jo izmerili na obriti koži, je večja od vrednosti, ki jo v literaturi navajajo za prašiče ( $165 \text{ J/m}^2$ ), in manjša od odmerka pri konjih ( $450 \text{ J/m}^2$ ) (Schmalwieser in sod., 2018). Pri ljudeh je vrednost MED odvisna od pigmentacije (Fitzpatrick, 1988). Bela področja kože pri kravah črno-bele pasme so posledica pomanjkanja melanocitov na teh področjih. To obarvanje imenujemo »piebald« in nastane zaradi motene migracije melanocitov na ta področja med fetalnim razvojem (Schmutz, 2012; Jivanji in sod., 2019). Ker je melanin eden glavnih dejavnikov zaščite pred UV sevanjem v koži, so ta mesta bolj občutljiva za UV poškodbe (Meredith in Sarna, 2006). Jasen kazalnik omenjenega sta fotosenzibilizacija in ploščatocelični karcinom, ki se pri govedu pojavljata predvsem na nepigmentirani koži (Anderson, 1991; Pausch in sod., 2012; Hussain in sod., 2018). UV zaščito koži nudijo tudi drugi dejavniki, kot so antioksidanti (karoteni, selen, vitamina E in C ter polifenoli), ki tudi vplivajo na MED (Sies in Stahl, 2004). UV svetloba povzroči poškodbe v koži s tvorbo kisikovih radikalov v celicah, poškodbe v celicah pa vodijo v vnetni odgovor, ki ga lahko s prostim očesom zaznamo kot rdečino. Ker antioksidanti nevtralizirajo kisikove radikale, zvišajo potreben odmerek UV sevanja za povzročitev vidne rdečine na koži (Sies in Stahl, 2004), s čimer bi lahko pojasnili razliko v vrednostih MED med ljudmi, prašiči in kravami, ki imajo približno enako debelo povrhnjico kože (Netzlaff in sod., 2006).

Dlaka je pomemben dejavnik zaščite pred UV sevanjem. Gostota dlake je večja pri telicah, saj je število dlačnih foliklov določeno ob rojstvu, a se ti razporedijo čez večjo površino pri kravah, ki so večje (Lyne in Heideman, 1959; Bianca in sod., 1974). V naši raziskavi smo ugotovili pozitivno povezanost med dolžino dlake in MED. UV prepustnost bele dlake je bila pri naših živalih 2,5–20 %, v povprečju 6,7 %, kar se ujema z izsledki predhodnih raziskav (Bianca in Wegmann, 1974). Oba dejavnika lahko pojasnita, zakaj smo pri telicah ugotovili višjo vrednost MED na odlakani koži. Gostota dlake se razlikuje med različnimi področji telesa, najbolj gosta je na plečih. Dolžina dlake se spreminja z letnimi časi in je največja pozimi (Bianca in sod., 1974; Udo, 1978). Spremembo v dolžini dlake (v povprečju za 8,4 milimetrov) smo ugotovili tudi v naši raziskavi, in sicer z merjenjem dolžine dlake marca in maja. Zato je lahko dejanska vrednost MED na odlakani koži pri govedu na različnih delih telesa in ob različnih letnih časih različna.

Pri ljudeh za varno UV obsevanje za pokritje dnevni potrebe po vitaminu D<sub>3</sub> velja Holickovo pravilo, ki priporoča, da se dnevno izpostavimo četrtini svoje vrednosti MED na četrtino svoje

telesne površine (Dowdy in sod., 2010). V drugem delu naše raziskave smo zato želeli ugotoviti, ali to velja tudi pri kravah. Na smiselnost predloga nakazujejo tudi izsledki nekaterih raziskav. V raziskavi, v kateri so krave obsevali od zadaj in po hrbtu z odmerkom  $1200 \text{ J/m}^2$  (približno četrtnina našega MED na odlakani koži), so ugotovili, da je odmerek zadostoval za dvig ravni  $25(\text{OH})\text{D}$  nad raven zadovoljivosti ( $> 30 \text{ ng/mL } 25(\text{OH})\text{D}$ ). V raziskavo so vključili 16 krav črno-bele pasme, ki so jih razdelili v štiri skupine. Vsaka skupina je prejela različen odmerek. Za obsevanje so uporabili UV luč, ki je posnemala valovne dolžine UV sevanja sonca.  $25(\text{OH})\text{D}_3$  so določali z metodo tekočinske kromatografije, sklopljene s tandemsko masno spektrometrijo (Jakobsen in sod., 2015). V drugi raziskavi so ugotovili, da je 90-minutno dnevno izpostavljanje naravnemu sevanju na paši z odmerkom  $1800 \text{ J/m}^2$  (približno tretjina našega MED na odlakani koži) povsem dovolj za vzdrževanje ravni vitamina D v krvi krav črno-bele pasme. Dvajset krav so razdelili v 5 skupin in jim odmerili čas paše (15–300 minut), razporejen okoli zenita. Vrednost  $25(\text{OH})\text{D}_3$  so določali z metodo visokozmogljive tekočinske kromatografije (Hymøller in Jensen, 2012).

V naši raziskavi smo uporabili UVB luč ozkega spektra, kar bi lahko vplivalo na vrednost MED na odlakani koži, ker sevanja višjih valovnih dolžin bolje prehajajo dlako (de Gálvez in sod., 2015). Zato bi morda ugotovili nižje MED na odlakani koži pri uporabi višjih valovnih dolžin, a smo pri uporabi višjih valovnih dolžin ponovno omejeni, saj imajo daljše valovne dolžine slabšo sposobnost povzročitve rdečine (ISO 17166:1999). Za valovno dolžino približno 295 nm smo se odločili zaradi optimalne proizvodnje vitamina  $\text{D}_3$  pri tej valovni dolžini (MacLaughlin in sod., 1982). Za nadaljnje raziskave MED pri govedu tako predlagamo tudi meritev gostote dlake na mestu obsevanja in obsevanje na različnih delih telesa. Tudi s krajšimi intervali med odmerki bi lahko vrednost MED določili bistveno bolj natančno, kot smo ga. V raziskavi smo posplošili, da je pri kravah učinkovitost različnih valovnih dolžin za povzročitev rdečine enaka kot pri ljudeh, kar pa ne velja nujno.

Za bolj objektivno oceno rdečine priporočamo uporabo spektrofotometra. V naši raziskavi smo potrebovali le okvirne vrednosti MED na dorzalnem delu živali, in sicer zaradi drugega dela raziskave. Zato smo se odločili za vizualno oceno rdečine.

## 5.2 SPOSOBNOST SINTEZE VITAMINA D V KOŽI POD VPLIVOM OBSEVANJA MED ROBOTSKO MOLŽO

### 5.2.1 Vitamin D

Kontrolna skupina je imela na začetku raziskave najvišje koncentracije 25(OH)D (Tabela 5). Koncentracija slednjega se je pri tej skupini nepričakovano povečala tudi med prvim in drugim vzorčenjem. Tudi pri obsevanih skupinah smo v tem času opazili večje povečanje vrednosti 25(OH)D kot pri nadaljnjih vzorčenjih. Ker smo raziskavo izvajali spomladi, ko se količina dnevnega sončnega obsevanja povečuje, bi lahko krave preko odbojev dobile tudi nekaj naravnega UV sevanja. Vendar se nespecifično povečevanje koncentracij 25(OH)D pri nadaljnjih vzorčenjih ni nadaljevalo, kar bi pričakovali, če bi bil to razlog povečanja. Možno je, da je povečanje posledica nihanja vsebnosti vitamina D v obroku, kar bi lahko potrdili z vzorčenjem obroka pri drugem vzorčenju, ki ga v protokolu raziskave nismo predvideli. Zato smo za primerjavo 25(OH)D med skupinami namesto koncentracije 25(OH)D pri posameznem vzorčenju uporabili razlike med prvim vzorčenjem in ostalimi vzorčenji,

Krave v obriti skupini so proizvedle največ 25(OH)D. Sledile so odlakane krave, medtem ko je kontrolna skupina ostala na približno enaki ravni, razen povečanja koncentracij med prvim in drugim vzorčenjem (Slika 11). Pri vseh kravah v obriti skupini se je raven 25(OH)D skozi vsa vzorčenja povečevala.

Na začetku raziskave je imelo nekaj krav koncentracije vitamina D  $< 10$  ng/mL, kar velja za hudo pomanjkanje. Med raziskavo je večina z UV obsevanih krav (22/30) presegla mejo 20 ng/mL 25(OH)D v krvi, ki velja za spodnjo kritično mejo pomanjkljive oskrbljenosti, le ena pa je presegla mejo 30 ng/mL 25(OH)D, kar pri kravah velja za zadovoljivo vsebnost (Nelson in sod., 2016b). Nobena krava ni dosegla vrednosti nad 40 ng/mL, ki jih Nelson in Marriman predlagata kot optimalne (2014). S Slike 11 je razvidno, da se je raven 25(OH)D ob koncu raziskave še povečevala, torej bi lahko s časom vse krave presegle zadovoljive koncentracije in morda tudi optimalne. Pri odlakanih kravah bi lahko uporabili višji dnevni odmerek obsevanja, ne da bi tvegali rdečino (opeklino). To bi lahko dosegli z uporabo močnejše UV luči ali z daljšim časom obsevanja. Molža je pri odlakanih kravah v naši raziskavi trajala v povprečju 17 minut in 33 sekund, kar je nekoliko manj kot v ameriški raziskavi (19 minut 54 sekund) (Tremblay in sod., 2016). V dveh minutah in 21 sekundah bi naša luč proizvedla dodatnih 28,8 J/m<sup>2</sup> na dan, kar je več kot tretjina dnevnega odmerka, uporabljenega pri obrutih kravah.

Maksimalno dnevno kožno sintezo vitamina D<sub>3</sub> pri odlakanih kravah (1 ng/mL/dan) so v raziskavi ugotovili pri odmerku 1800 J/m<sup>2</sup>, pri čemer so krave obsevali z UV lučjo širokega valovnega spektra po hrbtu in od zadaj, kar je večja površina kot površina v naši raziskavi (Hymøller in sod., 2017). To vrednost bi lahko po podatkih iz literature najverjetneje preseгли, saj je kožna sinteza vitamina D optimalna pri uporabi nižjih valovnih dolžin (Kalajian *in sod.*, 2017). Proizvodnja vitamina D je pozitivno odvisna tudi od obsevane površine, kar pomeni, da bi lahko dosegli višjo proizvodnjo, če bi obsevali celotno kožno površino (Hymøller in Jensen, 2010a).

V naši raziskavi smo ugotovili pozitivno povezanost med dnevnim odmerkom sevanja in proizvedenim vitaminom D, kar je presenetljivo, saj povezave med koncentracijo vitamina D v obroku in koncentracijo 25(OH)D v krvi ne ugotavljamo vedno. Raven vitamina D je odvisna od števila dni po telitvi, saj imajo krave manj kot 30 dni po telitvi manjše koncentracije vitamina D kot krave v poznejših stadijih laktacije. Razlog je morda manjši vnos vitamina D v obdobju presušitve, pa tudi povečane potrebe po vitaminu D in spremembe v dostopnosti VDBP (Nelson in sod., 2016a). Po tem lahko sklepamo, da je koncentracija 25(OH)D odvisna tudi od drugih dejavnikov, kot je dejanski vnos vitamina D pri posamezni kravi, ki se lahko razlikuje od vnosa, izračunanega iz obroka.

### 5.3 VPLIV DLAKE IN BARVE DLAKE OZ. KOŽE NA SINTEZO VITAMINA D V KOŽI

Krave proizvajajo vitamin D s celotno površino kože, ne samo na slabo odlakanih mestih (Hymøller in Jensen, 2010a), čeprav dlaka zavira prehajanje UV sevanja (de Gálvez in sod., 2015). V naši raziskavi so največ 25(OH)D proizvedle obrite krave in tudi pri ovcah so ugotovili, da obrite ovce proizvedejo več vitamina D (Quarterman in sod., 1964; Hidiroglou in Karpinski, 1989). V prvem delu raziskave smo ugotovili, da dlaka slabo prepušča UV svetlobo, kar je zaviralo prehod UV svetlobe potrebne za proizvodnjo vitamina D v odlakani skupini, ki je kljub skoraj trikrat večjemu odmerku v povprečju proizvedla manj vitamina D.

Pri obriti skupini je bila razlika v vsebnosti vitamina D v krvi med prvim in četrtem vzorčenjem negativno povezana z deležem črne kože na mestu obsevanja ( $p = 0,009$ ). Kot smo ugotovili v prvem delu raziskave, dlaka slabo prepušča UV svetlobo. Različna dolžina dlake med kravami je najverjetneje botrovala dejstvu, da te povezave nismo ugotovili pri odlakanih kravah. Tudi v drugih raziskavah niso ugotovili vpliva barve dlake na proizvodnjo vitamina D (Hymøller in Jensen, 2012; Jakobsen in sod., 2015; Hymøller in sod., 2017), a je znano, da je koncentracija



25(OH)D manjša pri alpakah s temnejšo volno (Judson in sod., 2008) in tudi pri teletih v Afriki s temnejšo dlako (Callaby in sod., 2020). Razlaga, zakaj so v slednjih raziskavah ugotovili omenjeno povezavo, bi lahko bila v bolj izenačeni dolžini dlake pri alpakah in teletih ter drugih vplivih na koncentracijo 25 (OH)D pri kravah v laktaciji (razlika v prireji mleka, koliko dni so v laktaciji itd.). V raziskavo na teletih so vključili teleta druge pasme in podvrste (*Bos indicus*), ki imajo drugačno barvo kože kot teleta črno-bele pasme in torej morda drugačne prilagoditve na UV sevanje.

### 5.3.1 Hemogram in biokemija

Posebno pozornost smo namenili dejstvu, da bi med obsevanjem lahko prišlo do fotosenzibilizacije ali tvorbe hepatotoksičnih snovi, kar s preiskavami krvi v raziskavi nismo zaznali. Ker klinično in na podlagi vrednosti hemograma in biokemije nismo zaznali nobenega vnetja ali hepatotoksičnosti, lahko sklepamo, da naše obsevanje vsaj kratkoročno živalim ni škodovalo. Med raziskavo tudi nismo zaznali nobenih sprememb v številu levkocitov, povezanih z rastjo koncentracije 25(OH)D v krvi, kar se ujema z raziskavo na kravah molznicah črno-bele pasme, pri katerih so raven vitamina D povečali z nadomeščanjem vitamina D v krmi, z izpostavitvijo sončnemu sevanju ali s kombinacijo obojega (Yue in sod., 2018), in z raziskavo, v kateri so kravam v krmo dodajali vitamin D<sub>3</sub> ali 25(OH)D v različnih koncentracijah (Poindexter in sod., 2020). V prvi raziskavi tudi niso zaznali povišanja levkocitov pri kravah, ki so bile izpostavljene soncu, v primerjavi z neobsevanimi skupinami. V raziskavi, ki so jo opravili na bikih, pa so ugotovili, da lahko vitamin D ugodno vpliva na raven hemoglobina in raven hematokrita (z vplivom na maturacijo in proliferacijo eritrocitov ter sintezo eritropoetina) ter negativno na število levkocitov (protivnetni učinek vitamina D), a so v raziskavi uporabili zelo visoke odmerke vitamina D (Keywanloo in sod., 2021).

### 5.3.2 Prireja mleka

V naši raziskavi nismo ugotovili značilnih razlik v prireji mleka z uporabo podatkov iz mlečnih kontrol. Analiza dnevno zbranih podatkov iz molznega robota je pokazala značilne razlike med vsemi tremi skupinami. Krave v obsevanih skupinah so lahko vzdrževale koncentracijo vitamina D med celotno raziskavo, medtem ko smo le v kontrolni skupini ugotovili negativno povezanost med trajanjem raziskave in prirejo mleka. Prav tako pri nobenem vzorčenju nismo ugotovili povezanosti med ravnijo vitamina D in kumulativno dnevno prirejo mleka. V času raziskave smo iz obeh obsevanih skupin izločili tri krave, kar je morda tudi delno vplivalo na

razliko. Krave so bile pomolžene večkrat na dan, kar je lahko vplivalo na prirejo v 24 urah, če so se posamezne krave kakšen dan molzle večkrat kot običajno. To je razvidno iz opaznih nihanj v proizvodnji mleka med zaporednimi dnevi (Slika 13). V nekaterih raziskavah niso ugotovili povezave med nadomeščanjem vitamina D ali 25(OH)D in proizvodnjo mleka. V eni od raziskav so uporabili 60 krav molznic črno-bele pasme, ki so jim dodajali vitamin D<sub>3</sub> in ali 25(OH)D<sub>3</sub> v različnih kombinacijah pred telitvijo in po njej (Guo in sod., 2018), v drugi raziskavi pa so 20 kravam molznicam črne-bele pasme v krvi dvignili raven 25(OH)D s 13,5 na 28–46,1 ng/mL v 29 dneh. Vitamin D so dodajali z dodajanjem vitamina D<sub>2</sub> in/ali vitamina D<sub>3</sub> v krmo, z izpostavljanjem soncu na paši 6,5 ure dnevno ter z dodajanjem vitamina D<sub>2</sub> v krmo in s pašo (6,5 ure) (Yue in sod., 2018). V tretji raziskavi so kravam (n = 1182) dodajali samo 25(OH)D<sub>3</sub> od 21 dni pred telitvijo do konca laktacije (Golder in sod., 2021), medtem ko so v drugih raziskavah ugotovili, da krave, ki so dobile nadomestek vitamina D (40000 IE vitamina D<sub>2</sub> na dan) oz. so imele več 25(OH)D v krvi, proizvedejo več mleka (National Research Council, 2001; Martinez in sod., 2018). V slednjo raziskavo so vključili 79 krav črno-bele pasme, ki so jim 21 dni pred telitvijo v kombinaciji z anionskimi solmi dodajali vitamin D<sub>3</sub> oz. 25(OH)D<sub>3</sub>.

Za določitev odločujočega dejavnika v naši raziskavi bodo potrebne nadaljnje raziskave in tudi bolj natančno spremljanje različnih dejavnikov, ki lahko vplivajo na prirejo mleka (dnevni vnos krme, pojavnost mastitisa, dnevi po telitvi) v povezavi z vitaminom D, ki bi ga morali meriti bolj pogosto.

## 6 SKLEPI

- 1) Vrednost MED krav molznic črno-bele pasme, izpostavljenih UVB valovne dolžine 280–315 nm, na mestih belega obarvanja ne presega enkratnega odmerka  $10.000 \text{ J/m}^2$ , a je še vedno nekajkrat višja od odmerka, ki ga navajajo v literaturi ( $100 \text{ J/m}^2$ ) (Mehlhorn in Steiger, 1975).
- 2) Obsevanje uporabljene intenzivnosti z UVB ozkega spektra valovnih dolžin, omejeno na čas robotske molže, ki ne presega vrednosti MED krav, pri trajno uhlevljenih kravah molznicah črno-bele pasme ni zadostovalo za vzdrževanje fizioloških koncentracij vitamina D.
- 3) Dolžina dlake pomembno vpliva na sintezo vitamina D v koži, saj so obrite krave proizvedle značilno več 25(OH)D kljub nižjemu prejetemu odmerku UVB sevanja.
- 4) Delež črno obarvane kože vpliva na sintezo 25(OH)D pri obratih kravah, saj je bil delež črne kože negativno povezan s koncentracijo 25(OH)D v krvi.
- 5) Povezanosti med deležem črne dlake na mestu obsevanja in proizvodnjo 25(OH)D nismo ugotovili.

## 7 POVZETEK

Vitamin D je esencialni vitamin za govedo in tudi za ljudi. Njegovo vlogo v telesu povezujemo predvsem s presnovo kalcija in fosforja ter z vzdrževanjem homeostaze kosti, v novejših raziskavah pa tudi z delovanjem imunskega sistema. Krave molznice lahko vitamin D pridobivajo na dva načina, in sicer s krmo in z lastno sintezo v koži pod vplivom UVB svetlobe. Ker vzreja večine govedi poteka pretežno v pokritih hlevih brez neposrednega stika s sončnim UV sevanjem, je vnos odvisen od vitamina D v krmi, ki ni vedno najboljše izkoristljiv in ob čezmernem dajanju lahko povzroči intoksikacijo. Ker je sinteza vitamina D v koži natančno uravnavana, do intoksikacije ne more priti in je tako bolj naraven, varen in učinkovit način nadomeščanja vitamina D. Pri tem se moramo zavedati, da so krave, tako kot ljudje, dovzetne za sončne opekline. V literaturi navedena vrednost minimalnega odmerka za povzročitev rdečine pri govedu je  $100 \text{ J/m}^2$ , a je to področje slabo raziskano, saj so v kasnejših raziskavah uporabili višje odmerke, ki pa na koži goveda niso povzročili rdečine. V literaturi se pojavljajo različni načini podajanja moči UV luči, ki so jih uporabljali v raziskavah, kar otežuje primerjavo izsledkov različnih raziskav. UV luči so v raziskavah že uporabljali za nadomeščanje vitamina D pri govedu, a so žal potekale na majhnem številu živali v eksperimentalnih pogojih. Tudi čas obsevanja je bil relativno dolg in nepraktičen za uporabo v komercialnih farmah. V naši raziskavi smo želeli določiti minimalni odmerek za povzročitev rdečine pri kravah črno-bele pasme na standardiziran način, ki omogoča primerjavo podatkov med različnimi raziskavami in opredeljuje varen odmerek UVB sevanja za nadomeščanje vitamina D pri kravah molznicah črno-bele pasme. Preizkusiti smo želeli tudi smotrnost uporabe nadomeščanja vitamina D z obsevanjem krav z UV lučjo ozkega spektra v komercialni reji z robotsko molžo ter ugotoviti vpliv dlake in barve kože oziroma dlake na mestu obsevanja na sintezo vitamina D v koži pri govedu.

V prvi del raziskave smo vključili 21 krav in telic črno-bele pasme z dveh kmetij, ki smo jih obsevali s stopnjujočimi se odmerki UVB sevanja na 8 odlakanih in 8 obrutih mestih z UVB lučjo ozkega spektra. Rezultate obsevanja smo odčitali po 24 urah. Ugotovili smo, da krave črno-bele pasme za povzročitev rdečine na obriti beli koži potrebujejo v povprečju odmerek  $329 \text{ J/m}^2$ , na odlakani koži pa odmerek  $5595 \text{ J/m}^2$ . Slednji odmerek je bil pozitivno linearno odvisen od dolžine dlake, s čimer lahko pojasnimo, zakaj so telice z daljšo dlako za povzročitev rdečine na odlakani koži potrebovale značilno višji odmerek. V drugi del raziskave smo vključili 51 krav črno-bele pasme, ki smo jih na podlagi mlečnosti v predhodni laktaciji, dneva

po telitvi in deleža črne dlake na hrbtu razdelili v tri skupine. Krave v prvi skupini smo obrili in obsevali z  $80 \text{ J/m}^2$ , krave v drugi skupini smo obsevali z maksimalnim odmerkom, ki ga je dopuščala dnevna robotska molža, a ni presegala  $360 \text{ J/m}^2$ , krave v tretji skupini pa so služile kot kontrolna skupina. Krave smo obsevali vsak dan v času robotske molže s točno določenim odmerkom glede na skupino. Proces zaznave krav in vklopa UV luči je bil avtomatiziran z računalniškimi programi. V času raziskave smo kravam štirikrat odvzeli kri – prvi dan ter 7 dni, 30 dni in 60 dni po začetku obsevanja – ter določili vrednosti 25-hidroksivitamina D. Obrita skupina je proizvedla največ 25(OH)D ( $13,37 \text{ ng/mL}$ ), sledila ji je odlakana skupina ( $9,96 \text{ ng/mL}$ ), kontrolna skupina pa je vrednosti 25(OH)D le vzdrževala po nespecifičnem dvigu med prvim in drugim vzorčenjem ( $5,11 \text{ ng/mL}$ ). V času raziskave na nobeni kravi nismo zaznali rdečine in krave niso kazale nobenih znakov nelagodja. Tudi z krvnimi preiskavami nismo zaznali vnetja. Ugotovili pa smo, da je nadomeščanje vitamina D z obsevanjem z UVB lučjo ozkega spektra v času robotske molže mogoče, saj je večina krav (22/30) presegla mejo 25-hidroksivitamina D, ki se smatra pomanjkanje, ena pa je presegla mejo  $30 \text{ ng/mL}$ , ki še velja za zadovoljivo raven vitamina D v krvi. Ugotovili smo tudi, da je kožna sinteza odvisna od barve kože in pokritosti z dlako na mestu obsevanja. Vpliva barve dlake na mestu obsevanja nismo potrdili. Obsevane krave v naši raziskavi so proizvedle značilno več mleka kot krave v kontrolni skupini, a večje proizvodnje mleka nismo uspeli povezati z višjimi vrednostmi 25(OH)D v krvi.

Naša raziskava je prva raziskava, v kateri smo določili minimalne odmerke za povzročitev rdečine pri kravah molznicah črno-bele pasme na obriti in odlakani koži na standardiziran način, ki omogoča primerjavo odmerkov med različnimi raziskavami. Ugotovili smo pozitivno linearno odvisnost med minimalnim odmerkom za povzročitev rdečine in dolžino bele dlake. Ker sta lahko ugotovljena odmerka za povzročitev rdečine v krajih na zmernih geografskih širinah presežena, moramo za zagotovitev dobrobiti govedu na paši ponuditi zavetje, kamor se lahko umakne pred neposrednim sončnim sevanjem. V drugem delu raziskave smo kot prvi ugotovili, kako dlaka in barva kože vplivata na sintezo vitamina D v koži krav črno-bele pasme, saj so obrite krave proizvedle največ vitamina D, proizvodnja pa je bila odvisna od deleža črne kože na mestu obsevanja. Vpliva barve dlake nismo ugotovili, kar se ujema z rezultati drugih raziskav. S tem smo ponudili nov način nadomeščanja vitamina D, ki nima kratkoročnih škodljivih učinkov na zdravje krav in ne moti dnevne rutine komercialnih farm.

## 8 SUMMARY

Vitamin D is an essential vitamin for cattle as well as for humans. Its role in the body is most commonly associated with the metabolism of calcium and phosphorus and control of bone homeostasis. Newer studies, connect it to the workings of the immune system. Dairy cows can get vitamin D in two ways. Through consumption in feed or self-synthesis in skin under the influence of UVB light. Because most cattle are raised in sheltered stalls without access to direct UV irradiation from the sun, they are completely reliant on the vitamin D in feed, which is not always the most utilisable and can cause intoxication with over supplementation. Because cutaneous vitamin D synthesis is strictly regulated, intoxication is impossible and represents a more natural, safe and efficient way of supplementing vitamin D. However, we need to acknowledge that cattle like humans are susceptible to sunburn. In the literature the minimal erythema dose for cattle was 100 J/m<sup>2</sup>. However, this field is poorly researched as newer studies used higher doses with no erythema on the skin of cattle. In the literature the power of UV lights used in studies is given in different ways, which makes the comparison of studies difficult. UV lamps have already been used for vitamin D supplementation in past studies; however, the studies used relatively few animals and they were done in experimental settings. Additionally, time of irradiation was relatively long and impractical for use in a commercial farm. The goal of our study was to determine the minimal erythema dose for Holstein Friesian cattle in a standardised way, which would allow comparison of data from different studies and also to determine the safe UVB dose for vitamin D supplementation in Holstein Friesian cattle. We also wanted to assess the usefulness of vitamin D supplementation with a narrow-band UV light in a commercial farm with automated milking and determine the effect of hair and colour of skin or hair at the irradiation area on cutaneous vitamin D production in cattle.

In the first part of our study, we have included 21 cows and heifers of the Holstein Friesen breed from two farms, which we irradiated with increasing UVB doses on 8 haired and 8 shaven areas with a narrow-band UVB lamp. We assessed the results after 24 hours. We found that cows of the Holstein Friesen breed require on average 329 J/m<sup>2</sup> for erythema production on shaven white skin and 5595 J/m<sup>2</sup> on haired skin. The latter dose is positively linearly correlated with hair length, which also explains why heifers with longer hair required a significantly higher dose to produce erythema on haired skin. In the second part of our study, we enrolled 51 dairy cows of the Holstein Friesen breed, which we have divided into three groups based on milk yield in the previous lactation, days since calving and the percent of black fur on the back. The

first group was shaven every two weeks and irradiated with  $80 \text{ J/m}^2$ , the second group was irradiated with the maximum dose that daily robot milking time would allow but not exceeding  $360 \text{ J/m}^2$ , the third group served as a control group. The cows were irradiated each day during robot milking time with a specific dose dependent on the group. The process of cow identification and turning on of the light was automated with the help of computer software. During the study the cows were blood sampled four times on the first day, 7 days, 30 days and 60 days after the start of irradiation and the concentrations of 25-hydroxyvitamin D in the samples were determined. The shaven group produced the most 25(OH)D (13.37 ng/mL), followed by the haired group (9.96 ng/mL), the control group only maintained its 25(OH)D concentrations after the unspecific raise between the first and second sampling (5.11 ng/mL). During the study we didn't detect any erythema on any of the cows and cows showed no signs of discomfort. We didn't detect any inflammation also on the blood analysis. We found that vitamin D supplementation using a narrow-band UVB lamp limited to robot milking time is possible, as most cows (22/30) surpassed the threshold of 25-hydroxyvitamin D concentrations that is considered as deficiency. One cow surpassed the threshold of 30 ng/mL, which is regarded as a sufficient concentration of vitamin D in blood. We also found that cutaneous vitamin D production is dependent on skin colour and hair cover at the area of irradiation. We did not find an influence of hair colour at the irradiation site. The irradiated cows in our study produced significantly more milk compared to the control group, however, we were unable to connect the higher milk yield to higher concentrations of 25(OH)D in the blood.

This study is the first to determine the minimal erythema dose in Holstein Friesian dairy cattle on shaven and haired skin in a standardised way, which allows the comparison of doses between different studies. We also found a positive linear correlation between the minimal erythema dose on haired skin and hair length. Because the determined minimal erythema doses are easily exceeded at mild latitudes, it is important for welfare reasons that cattle on pasture have shelter where they can get out of direct sun irradiation. With the second part of our study, we were the first to find an effect of hair and skin colour on cutaneous vitamin D production in Holstein Friesian cattle, as shaven cows produced the most vitamin D and the production was dependent on the percentage of black skin at the irradiation area. We did not detect an effect of hair colour, which is in agreement with previous studies. With this we put forward a new way of vitamin D supplementation that has no short-term negative effects on the health of the cows and does not interfere with daily farm routine.

J. J. Hodnik: Vpliv ultravijoličnega-B sevanja... na koncentracijo vitamina D v krvi krav molznic...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2023. Doktorska disertacija

---



## 9 ZAHVALE

Zahvalil bi se rad:

- mentorju, prof. dr. Jožetu Stariču, ki mi je bil vedno pripravljen pomagati in je zame vedno našel čas;
- Vsem na Kliniki za prežvekovalce, ki so pomagali pri oblikovanju raziskave, vzorčenju na kmetiji, izvedbi laboratorijskih analiz in me spodbujali med izvedbo raziskave in pisanjem doktorskega dela;
- dr. Marku Jankovcu ter Žigi in Jožetu Krušiču za izdelavo UV luči ter elektrotehnično podporo;
- zaposlenim na Inštitutu za varno hrano, krmo in okolje za izvedbo analize krme;
- zaposlenim na KŽK d.o.o. za pomoč pri izvedbi prvega dela raziskave;
- lastniku živali g. Gašperju Zabretu in njegovi družini, ki so nas vedno lepo sprejeli in pomagali pri izvedbi raziskave na kmetiji;
- Kaji, Pici, Brigiti, Udbi, Cedri, Tari, Cimi, Maci, Krimi, Pisi, Kanji, Tunki, Heidi, Mrhi, Bojki, Cesti, Lajki, Rogli†, Bori†, Loti, Brezi, Bajni, Vitki, Jasni, Ceni, Celi, Resi, Bilki, Borzi, Ronki, Pšati†, Bandi†, Barki, Inki, Muri, Cevki, Komni, Banki, Polki, Elmi, Coli, Brini, Trenti, Jeri, Cajni, Cibi, Bosi, Celei, Cisti, Pivki, Bunki in Uni, ki so kooperativno sodelovale pri vzorčenju in britju ter pridno hodile na molžo;
- dr. Janezu Jeretini s Kmetijskega inštituta Slovenije za zbiranje in posredovanje podatkov o molži;
- Katarini Faganel za lektoriranje;
- Društvu Podiplomskih študentov VF in podpornikom za nasvete in spodbujanje;
- družini in prijateljem za brezpogojno ljubezen in podporo.

**10 LITERATURA**

Abboud M, Rybchyn MS, Liu J, et al. The effect of parathyroid hormone on the uptake and retention of 25-hydroxyvitamin D in skeletal muscle cells.

*J Steroid Biochem Mol Biol* 2017; 173: 173–9.

Adalsteinsson S, Bjarnadottir S, Vage DI, Jonmundsson JV. Brown coat color in Icelandic cattle produced by the loci Extension and Agouti. *J Hered* 1995; 86(5): 395–8.

Adams JS, Liu PT, Chun R, Modlin RL, Hewison M. Vitamin D in defense of the human immune response. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1117: 94–105.

Anderson DE. Genetic study of eye cancer in cattle. *J Hered* 1991; 82(1): 21–6.

Asgharpour P, Dezfouli MRM, Nadealian MG, Eftekhari Z, Borojeni GRN. Effects of 1, 25-dihydroxy vitamin D3 on clinical symptoms, pro-inflammatory and inflammatory cytokines in calves with experimental pneumonia. *Res Vet Sci* 2020; 132: 186–93.

Aucella F, Scalzulli RP, Gatta G, Vigilante M, Carella AM, Stallone C. Calcitriol increases burst-forming unit-erythroid proliferation in chronic renal failure: a synergistic effect with r-HuEpo. *Nephron Clin Pract* 2003; 95(4): c121–7.

Baxter LL, Hou L, Loftus SK, Pavan WJ. Spotlight on spotted mice: a review of white spotting mouse mutants and associated human pigmentation disorders.

*Pigment Cell Res* 2004; 17(3): 215–24.

Bianca W, Wegmann-Bosshardt H, Näf F. Untersuchungen an Rinderhaaren. *J Anim Breed Genet* 1974; 91(1|4): 217–31.

Bianca W, Wegmann H. Die Durchlässigkeit von Rinderhaaren für ultraviolette Strahlung. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1974; 116: 114–6.

Bikle DD. The free hormone hypothesis: when, why, and how to measure the free hormone levels to assess vitamin D, thyroid, sex hormone, and cortisol status.

*JBMR plus* 2020; 5(1): e10418 (10 str.) doi: 10.1002/jbm4.10418.

Bikle DD, Siiteri PK, Ryzen E, Haddad JG. Serum protein binding of 1,25-dihydroxyvitamin D: a reevaluation by direct measurement of free metabolite levels.

*J Clin Endocrinol Metab* 1985; 61(5): 969–75.

Bilbao J, de Migue A. Erythematous solar irradiance, UVER, and UV index from ground-based data in central Spain. *Appl Sci* 2020; 10(18): e6589 (14 str.) doi: 10.3390/app10186589.

Burchill SA, Thody AJ, Ito S. Melanocyte-stimulating hormone, tyrosinase activity and the regulation of eumelanogenesis and pheomelanogenesis in the hair follicular melanocytes of the mouse. *J Endocrinol* 1986; 109 (1): 15–21.

Callaby R, Hurst E, Handel I, Toye P, Bronsvort BMC, Mellanby RJ. Determinants of vitamin D status in Kenyan calves. *Sci Rep* 2020; 10(1): e20590 (14 str.) doi: 10.1038/s41598-020-77209-5.

Cashman KD, O'Sullivan SM, Galvin K, Ryan M. Contribution of Vitamin D 2 and D 3 and Their Respective 25-Hydroxy Metabolites to the Total Vitamin D Content of Beef and Lamb. *Curr Dev Nutr* 2020; 4(7): enzaa112(6 str.) doi: 10.1093/cdn/nzaa112.

Celi P, Williams S, Engstrom M, McGrath J, La Marta J. Safety evaluation of dietary levels of 25-hydroxyvitamin D 3 in growing calves. *Food Chem Toxicol* 2018; 111: 641–9.

CIE 174:2006. Action spectrum for the production of previtamin D<sub>3</sub> in human skin. Dunaj: International Commission on Illumination, 2006: 16 str.

CIE 209:2014. Rationalizing nomenclature for UV doses and effects on humans. Dunaj: International Commission on Illumination, 2014: 14 str.

de Gálvez MV, Aguilera J, Bernabø JL, Sánchez-Roldán C, Herrera-Ceballos E. Human hair as a natural sun protection agent: a quantitative study.

*Photochem Photobiol* 2015; 91(4): 966–70.

de Gruijl FR. Action spectrum for photocarcinogenesis.

*Recent Results Cancer Res* 1995; 139: 21–30.

D'Mello SA, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling pathways in melanogenesis. *Int J Mol Sci* 2016; 17(7): e1144 (18 str.) doi: 10.3390/ijms17071144.

Dittmer K, Thompson K. Vitamin D Metabolism and Rickets in Domestic Animals: a review. *Vet Pathol* 2011; 48(2): 389–407.

J. J. Hodnik: Vpliv ultravijoličnega-B sevanja... na koncentracijo vitamina D v krvi krav molznic...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2023. Doktorska disertacija

---

Dowdy JC, Sayre RM, Holick MF. Holick's rule and vitamin D from sunlight.

*J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 121(1|2): 328–30.

Duffy SK, O'Doherty JV, Rajauria G, et al. Vitamin D-biofortified beef: a comparison of cholecalciferol with synthetic versus UVB-mushroom-derived ergosterol as feed source.

*Food Chem* 2018; 256: 18–24.

Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D.

*Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289(1): F8–28.

Eder K in Grundmann SM. Vitamin D in dairy cows: metabolism, status and functions in the immune system. *Arch Anim Nutr* 2022; 76(1): 1–33.

el-Ghorr AA, Norval M. Biological effects of narrow-band (311 nm TL01) UVB irradiation: a review. *J Photochem Photobiol B* 1997; 38(2|3): 99–106.

Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI.

*AMA Arch Derm* 1988; 124(6): 869–71.

García-Borrón JC, Abdel-Malek Z, Jiménez-Cervantes C. MC1R, the cAMP pathway, and the response to solar UV: Extending the horizon beyond pigmentation.

*Pigment Cell Melanoma Res* 2014; 27(5): 699–720.

Golder HM, McGrath J, Lean IJ. Effect of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> during prepartum transition and lactation on production, reproduction, and health of lactating dairy cows.

*J Dairy Sci* 2021; 104(5): 5345–74.

Guo J, Jones AK, Givens DI, Lovegrove JA, Kliem KE. Effect of dietary vitamin D<sub>3</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> supplementation on plasma and milk 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> concentration in dairy cows. *J Dairy Sci* 2018; 101(4): 3545–53.

Gutiérrez-Gil B, Wiener P, Williams JL. Genetic effects on coat colour in cattle: dilution of eumelanin and pheomelanin pigments in an F<sub>2</sub>-Backcross Charolais × Holstein population.

*BMC Genet* 2007; 8(1): e56 (12 str.) doi: 10.1186/1471-2156-8-56.

Hanel A in Carlberg C. Skin colour and vitamin D: an update.

*Exp Dermatol* 2020; 29(9): 864–75.

J. J. Hodnik: Vpliv ultravijoličnega-B sevanja... na koncentracijo vitamina D v krvi krav molznic...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2023. Doktorska disertacija

---

Hayes BJ, Pryce J, Chamberlain AJ, Bowman PJ, Goddard ME. Genetic architecture of complex traits and accuracy of genomic prediction: coat colour, milk-fat percentage, and type in Holstein cattle as contrasting model traits.

*PLoS Genet* 2010; 6(9): e1001139 (11 str.) doi: 10.1371/journal.pgen.1001139.

Heaney RP, Dowell MS, Hale CA, Bendich A. Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J Am Coll Nutr* 2003; 22(2): 142–6.

Heckman CJ, Chandler R, Kloss JD, et al. Minimal Erythema Dose (MED) testing.

*J Vis Exp* 2013; 75: e50175 (5 str.) doi: 10.3791/50175.

Heaney JL, Valli VE. Bovine ocular squamous cell carcinoma: an epidemiological perspective.

*Can J Comp Med* 1985; 49(1): 21–6.

Herrmann M, Farrell CL, Pusceddu I, Fabregat-Cabello N, Cavalier E. Assessment of Vitamin D status - a changing landscape. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55(1): 3–26.

Hidiroglou M, Karpinski K. Providing vitamin D to confined sheep by oral supplementation vs ultraviolet irradiation. *J Anim Sci* 1989; 67(3): 794–802.

Holcombe SJ, Wisnieski L, Gandy J, Norby B, Sordillo LM. Reduced serum vitamin D concentrations in healthy early-lactation dairy cattle. *J Dairy Sci* 2018; 101(2): 1488–94.

Holick MF. Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D.

*Am J Clin Nutr* 1995; 61(suppl 3): S638–45.

Holick MF. Vitamin D Status: Measurement, Interpretation, and Clinical Application.

*Ann Epidemiol* 2009; 19(2): 73–8.

Holick MF, Maclaughlin JA, Clark MB, et al. Photosynthesis of previtamin D<sub>3</sub> in human skin and the physiologic consequences. *Science* 1980; 210(4466): 203–5.

Holick MF, MacLaughlin JA, Doppelt SH. Regulation of cutaneous previtamin D<sub>3</sub> photosynthesis in man: skin pigment is not an essential regulator.

*Science* 1981; 211(4482): 590–3.

Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA. Calcium and vitamin D metabolism during lactation.

*J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1997; 2(3): 253–63.

J. J. Hodnik: Vpliv ultravijoličnega-B sevanja... na koncentracijo vitamina D v krvi krav molznic...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2023. Doktorska disertacija

---

Horst RL, Reinhardt TA, Russel JR, Napoli JL. The isolation and identification of vitamin D<sub>2</sub> and vitamin D<sub>3</sub> from *Medicago sativa* (alfalfa plant).

*Arch Biochem Biophys* 1984; 231(1): 67–71.

Hovinen M, Pyörälä S. Invited review: udder health of dairy cows in automatic milking.

*J Dairy Sci* 2011; 94(2): 547–62.

Hussain SM, Herling VR, Rodrigues PHM, Naz I, Khan H, Khan MT. Mini review on photosensitization by plants in grazing herbivores.

*Trop Anim Health Prod* 2018; 50(5): 925–35.

Hymøller L, Jensen SK. Vitamin D<sub>3</sub> synthesis in the entire skin surface of dairy cows despite hair coverage. *J Dairy Sci* 2010(5); 93: 2025–9.

Hymøller L, Jensen SK. Stability in the rumen and effect on plasma status of single oral doses of vitamin D and vitamin E in high-yielding dairy cows.

*J Dairy Sci* 2010(12); 93: 5748–57.

Hymøller L, Jensen SK. Vitamin D<sub>2</sub> impairs utilization of vitamin D<sub>3</sub> in high-yielding dairy cows in a cross-over supplementation regimen. *J Dairy Sci* 2011; 94(7): 3462–6.

Hymøller L, Jensen SK. 25-Hydroxycholecalciferol status in plasma is linearly correlated to daily summer pasture time in cattle at 56°N. *Br J Nutr* 2012; 108(4): 666–71.

Hymøller L, Jensen SK, Kaas P, Jakobsen J. Physiological limit of the daily endogenous cholecalciferol synthesis from UV light in cattle.

*J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2017; 101(2): 215–21.

Hymøller L, Jensen SK, Lindqvist H, Johansson B, Nielsen MO, Nadeau E. Supplementing dairy steers and organically managed dairy cows with synthetic vitamin D<sub>3</sub> is unnecessary at pasture during exposure to summer sunlight. *J Dairy Res* 2009; 76(3): 372–8.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Solar and ultraviolet radiation. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1992:1-284.(NO. 55).

ISO 17166:1999. Erythema reference action spectrum and standard erythema dose. Dunaj:International Commission on Illumination, 1999: 12 str.

J. J. Hodnik: Vpliv ultravijoličnega-B sevanja... na koncentracijo vitamina D v krvi krav molznic...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2023. Doktorska disertacija

---

Jacobs JA, Siegford JM. Invited review: the impact of automatic milking systems on dairy cow management, behavior, health, and welfare. *J Dairy Sci* 2012; 95(5): 2227–47.

Jakobsen J, Jensen SK, Hymøller L, et al. Short communication: Artificial ultraviolet B light exposure increases vitamin D levels in cow plasma and milk.

*J Dairy Sci* 2015; 98(9): 6492–8.

Jäpelt RB, Didion T, Smedsgaard J, Jakobsen J. Seasonal variation of provitamin D 2 and vitamin D 2 in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.).

*J Agric Food Chem* 2011; 59(20): 10907–12.

Jäpelt RB, Jakobsen J. Vitamin D in plants: A review of occurrence, analysis, and biosynthesis.

*Front Plant Sci* 2013; 4: e136 (20 str.) doi: 10.3389/fpls.2013.00136.

Jivanji S, Worth G, Lopdell TJ, et al. Genome-wide association analysis reveals QTL and candidate mutations involved in white spotting in cattle. *Genet Sel Evol* 2019; 51(1): e62 (18 str.) doi: 10.1186/s12711-019-0506-2

John AJ, Clark CEF, Freeman MJ, Kerrisk KL, Garcia SC, Halachmi I. Review: milking robot utilization, a successful precision livestock farming evolution. *Animal* 2016; 10(9): 1484–92.

Jones G, Prosser DE, Kaufmann M. Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D.

*J Lipid Res* 2014; 55(1): 13–31.

Judson GJ, McGregor BA, Partington DL. Factors associated with low vitamin D status of Australian alpacas. *Aust Vet J* 2008; 86(12): 486–90.

Kalajian TA, Aldoukhi A, Veronikis AJ, Persons K, Holick MF. Ultraviolet B light emitting diodes (LEDs) are more efficient and effective in producing vitamin D3 in human skin compared to natural sunlight.

*Sci Rep* 2017; 7(1): e11489 (8 str.) doi: 10.1038/s41598-017-11362-2

Keywanloo M, Ahmadi-Hamedani M, Javan JA, Zabol RF. Effects of Parenteral Vitamin D3 Supplementation on Hematological Parameters of Healthy Holstein Bulls.

*Arch Razi Inst* 2021; 76(5): 1509–17.

J. J. Hodnik: Vpliv ultravijoličnega-B sevanja... na koncentracijo vitamina D v krvi krav molznic...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2023. Doktorska disertacija

---

King MTM, Pajor EA, LeBlanc SJ, DeVries TJ. Associations of herd-level housing, management, and lameness prevalence with productivity and cow behavior in herds with automated milking systems. *J Dairy Sci* 2016; 99(11): 9069–79.

Kinney JP, Long CS, Geller AC. The ultraviolet index: a useful tool.

*Dermatol Online J* 2000; 6(1): e2. doi: 10.5070/D35925w4hq

Kohler M, Leiber F, Willems H, Merbold L, Liesegang A. Influence of altitude on vitamin D and bone metabolism of lactating sheep and goats. *J Anim Sci* 2013; 91(11): 5259–68.

Kollias N, Sayre RM, Zeise L, Chedekel MR. New trends in photobiology: photoprotection by melanin. *J Photochem Photobiol B Biol* 1991; 9: 135–60.

Kopecky KE, Pugh GW Jr, Hughes DE, Booth GD, Cheville NF. Biological effect of ultraviolet radiation on cattle: bovine ocular squamous cell carcinoma.

*Am J Vet Res* 1979; 40(12): 1783–8.

Krause R, Bühring M, Hopfenmüller W, Holick MF, Sharma AM. Ultraviolet B and blood pressure. *Lancet* 1998; 352(9129): 709–10.

Lerche CM, Philipsen PA, Wulf HC. UVR: sun, lamps, pigmentation and Vitamin D. *Photochem Photobiol Sci* 2017; 16(3): 291–301.

Lippolis JD, Reinhardt TA, Sacco RA, Nonnecke BJ, Nelson CD. Treatment of an intramammary bacterial infection with 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>.

*PLoS One* 2011; 6(10): e25479 (7 str.) doi: 10.1371/journal.pone.0025479.

Littledike ET, Horst RL. Problems with vitamin D injections for prevention of milk fever [in dairy cows]: toxicity of large doses and increased incidence with small doses.

*Am Dairy Sci Assoc* 1980; 63(1): 89.

Liu L, Harris B, Keehan M, Zhang Y. Genome scan for the degree of white spotting in dairy cattle. *Anim Genet* 2009; 40(6): 975–7.

Lyne AG, Heideman MJ. The pre-natal development of skin and hair in cattle (*Bos taurus* L.).

*Aust J Biol Sci* 1959; 12(1): 72–95.

MacLaughlin JA, Anderson RR, Holick MF. Spectral character of sunlight modulates



J. J. Hodnik: Vpliv ultravijoličnega-B sevanja... na koncentracijo vitamina D v krvi krav molznic...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2023. Doktorska disertacija

---

photosynthesis of previtamin D<sub>3</sub> and its photoisomers in human skin.

*Science* 1982; 216(4549): 1001–3.

Malabanan AO, Turner AK, Holick MF. Severe generalized bone pain and osteoporosis in a premenopausal black female: effect of vitamin D replacement.

*J Clin Densitom* 1998; 1(2): 201–4.

Maresca V, Flori E, Picardo M. Skin phototype: a new perspective.

*Pigment Cell Melanoma Res* 2015; 28(4): 378–89.

Margier M, Collet X, le May C, et al. ABCB1 (P-glycoprotein) regulates vitamin D absorption and contributes to its transintestinal efflux. *FASEB J* 2019; 33(2): 2084–94.

Martinez N, Rodney RM, Block E, et al. Effects of prepartum dietary cation-anion difference and source of vitamin D in dairy cows: lactation performance and energy metabolism.

*J Dairy Sci* 2018; 101(3): 2544–62.

McKenzie RL, Lucas RM. Reassessing impacts of extended daily exposure to low level solar UV radiation. *Sci Rep* 2018; 8(1): e13805 (5 str.) doi: 10.1038/s41598-018-32056-3

Mehlhorn G in Steiger A. Künstliche UV-Strahlung in der Tierproduktion. Jene: Fischer, 1975:1-299.

Mello JRB. Calcinosis - calcinogenic plants. *Toxicon* 2003; 41(1): 1–12.

Meredith P, Sarna T. The physical and chemical properties of eumelanin.

*Pigment Cell Res* 2006; 19(6): 572–94.

Merriman KE, Kweh MF, Powell JL, Lippolis JD, Nelson CD. Multiple  $\beta$ -defensin genes are upregulated by the vitamin D pathway in cattle.

*J Steroid Biochem Mol Biol* 2015; 154: 120–9.

Moreau E, Bächer S, Mery S, et al. Performance characteristics of the VIDAS® 25-OH Vitamin D Total assay - comparison with four immunoassays and two liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods in a multicentric study.

*Clin Chem Lab Med* 2016; 54(1): 45–53.

J. J. Hodnik: Vpliv ultravijoličnega-B sevanja... na koncentracijo vitamina D v krvi krav molznic...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2023. Doktorska disertacija

---

Morrow CK, Colditz IG, Cope RB. Simulated solar UVB exposure inhibits transcutaneous immunization to cholera toxin via an irradiated skin site in cattle.

*Vet Immunol Immunopathol* 2001; 83(1|2): 107–14.

Mostafa WZ in Hegazy RA. Vitamin D and the skin: Focus on a complex relationship: a review. *J Adv Res* 2013; 6(6): 793–804.

National Research Council. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th ed. Washington: National Academy Press, 2001: 164-6.

Nelson CD, Lippolis JD, Reinhardt TA, et al. Vitamin D status of dairy cattle: outcomes of current practices in the dairy industry. *J Dairy Sci* 2016; 99(12): 10150–60.

Nelson CD, Merriman KE. Vitamin D metabolism in dairy cattle and implications for dietary requirements. In: 25th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium: proceedings. Gainesville: Institute of Food and Agricultural Sciences, 2014:78–90

Nelson CD, Powell JL, Price DM, et al. Assessment of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations of beef cows and calves across seasons and geographical locations.

*J Anim Sci* 2016; 94(9): 3958–65.

Nelson CD, Reinhardt TA, Lippolis JD, Sacco RE, Nonnecke BJ. Vitamin D signaling in the bovine immune system: a model for understanding human vitamin D requirements.

*Nutrients* 2012; 4(3): 181–96.

Netzlaff F, Schaefer UF, Lehr CM, et al. Comparison of bovine udder skin with human and porcine skin in percutaneous permeation experiments.

*Altern Lab Anim* 2006; 34(5): 499–513.

Nonnecke BJ, McGill JL, Ridpath JF, Sacco RE, Lippolis JD, Reinhardt TA. Acute phase response elicited by experimental bovine diarrhoea virus (BVDV) infection is associated with decreased vitamin D and E status of vitamin-replete preruminant calves.

*J Dairy Sci* 2014; 97(9): 5566–79.

Pausch H, Wang X, Jung S, et al. Identification of QTL for UV-protective eye area pigmentation in cattle by progeny phenotyping and genome-wide association analysis.

*PLoS One* 2012; 7: e36346 (10 str.) doi: 10.1371/journal.pone.0036346

J. J. Hodnik: Vpliv ultravijoličnega-B sevanja... na koncentracijo vitamina D v krvi krav molznic...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2023. Doktorska disertacija

---

Pitkäranta J, Kurkela V, Huotari V, Posio M, Halbach CE. Designing automated milking dairy facilities to maximize labor efficiency.

*Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2019; 35(1): 175–93.

Poindexter MB, Kweh MF, Zimpel R, et al. Feeding supplemental 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> increases serum mineral concentrations and alters mammary immunity of lactating dairy cows.

*J Dairy Sci* 2020; 103(1): 805–22.

Quarterman J, Dalgarno AC, Adam A. Some factors affecting the level of vitamin D in the blood of sheep. *Br J Nutr* 1964; 18: 79–89.

Ramagopalan S V., Heger A, Berlanga AJ, et al. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution.

*Genome Res* 2010; 20(10): 1352–60.

Reboul E. Intestinal absorption of vitamin D: From the meal to the enterocyte.

*Food Funct* 2015; 6: 356–62.

Reboul E, Goncalves A, Comera C, et al. Vitamin D intestinal absorption is not a simple passive diffusion: evidences for involvement of cholesterol transporters.

*Mol Nutr Food Res* 2011; 55(5): 691–702.

Reuder J in Koepke P. Reconstruction of UV radiation over Southern Germany for the past decades. *Meteorol Zeitschrift* 2005; 14(2): 237–46.

Rieder HE, Holawe F, Simic S, et al. Reconstruction of erythemal UV-doses for two stations in Austria: a comparison between alpine and urban regions.

*Atmos Chem Phys* 2008; 8: 6309–23.

Rowe LD. Photosensitization problems in livestock.

*Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1989; 5(2): 301–23.

Royo LJ, Alvarez I, Fernandez I, Arranz JJ, Gomez E, Goyache F. The coding sequence of the ASIP gene is identical in nine wild-type coloured cattle breeds.

*J Anim Breed Genet* 2005; 122: 357–60.

J. J. Hodnik: Vpliv ultravijoličnega-B sevanja... na koncentracijo vitamina D v krvi krav molznic...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2023. Doktorska disertacija

---

Rybchyn MS, Abboud M, Puglisi DA, et al. Skeletal muscle and the maintenance of vitamin D status. *Nutrients* 2020; 12(11): e3270 (11 str.) doi: 10.3390/nu12113270.

Saager RB, Balu M, Crosignani V, et al. *In vivo* measurements of cutaneous melanin across spatial scales: using multiphoton microscopy and spatial frequency domain spectroscopy. *J Biomed Opt* 2015; 20(6): e066005 (11 str.) doi: 10.1117/1.JBO.20.6.066005.

Sachdeva S. Fitzpatrick skin typing: applications in dermatology. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2009; 75(1): 93–6.

Saponaro F, Saba A, Zucchi R. An Update on vitamin D metabolism. *Int J Mol Sci* 2020; 21: e6573 (19 str.) doi: 10.3390/ijms21186573.

Schmalwieser AW, Weihs P, Schauburger G. UV Effects on Living Organisms. In: Meyers R ed. *Encyclopedia of sustainability science and technology*. New York: Springer, 2018; 1–63.

Schmutz S. Genetics of coat color in cattle. In: Womack JE ed. *Bovine genomics*. Hoboken: John Wiley & sons, 2012; 20–33.

Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological bone remodeling: systemic regulation and growth factor involvement. *Physiology* 2016; 31(3): 233–45.

Sies H, Stahl W. Nutritional protection against skin damage from sunlight. *Annu Rev Nutr* 2004; 24: 173–200.

Sorge US, Molitor T, Linn J, Gallaher D, Wells SW. Cow-level association between serum 25-hydroxyvitamin D concentration and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* antibody seropositivity: a pilot study. *J Dairy Sci* 2013; 96: 1030–7.

Spritz RA. The molecular basis of human piebaldism. *Pigment Cell Res* 1992; 5(5): 340–3.

Stabel JR, Reinhardt TA, Hempel RJ. Short communication: vitamin D status and responses in dairy cows naturally infected with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *J Dairy Sci* 2019; 102(2): 1594–600.

Tomkins NW, Elliott R, McGrath JJ, et al. Managing plasma P concentrations in beef heifers with a slow release vitamin D supplementation. *Anim Prod Sci* 2020; 60(5): 610–17.

Tremblay M, Hess JP, Christenson BM, et al. Factors associated with increased milk production

J. J. Hodnik: Vpliv ultravijoličnega-B sevanja... na koncentracijo vitamina D v krvi krav molznic...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2023. Doktorska disertacija

---

for automatic milking systems. *J Dairy Sci* 2016; 99(5): 3824–37.

Tsujita H in Plummer CE. Bovine Ocular Squamous Cell Carcinoma.

*Vet Clin North Am - Food Anim Pract* 2010; 26(3): 511–29.

Udo HMJ. Hair coat characteristics in Friesian heifers in the Netherlands and Kenya: Experimental data and a review of literature. Wageningen: H. Veenman & Zonen B.V, 1978.

van Dijk A, den Outer P, van Kranen H, Slaper H. The action spectrum for vitamin D3: initial skin reaction and prolonged exposure. *Photochem Photobiol Sci* 2016; 15(7): 896–909.

Ward G, Marion GB, Campbell CW, Dunham JR. Influences of calcium intake and vitamin D supplementation on reproductive performance of dairy cows. *J Dairy Sci* 1971; 54(2): 204–6.

Weihs P, Schmalwieser AW, Schauburger G. UV Effects on living organisms. In: Laws EA ed. Environmental toxicology: selected entries from the encyclopedia of sustainability science and technology. New York: Springer, 2013: 609–88.

Wilkens MR, Cohrs I, Lifschitz AL, Fraser DR, Olszewski K, Schroder B, Breves G. Is the metabolism of 25-hydroxyvitamin D3 age-dependent in dairy cows?

*J Steroid Biochem Mol Biol* 2013; 136: 44–6.

Yue Y, Hymøller L, Jensen SK, Lauridsen C. Effect of vitamin D treatments on plasma metabolism and immune parameters of healthy dairy cows. *Arch Anim Nutr* 2018; 72(3): 205–220.

Zhou S, LeBoff MS, Glowacki J. Vitamin D metabolism and action in human bone marrow stromal cells. *Endocrinology* 2010; 151(1): 14–22.

Ziv E, Bar-On H, Silver J. Vitamin D3 uptake by the isolated perfused rat liver from lipoprotein fractions is separate from cholesterol and triglyceride uptake.

*Eur J Clin Invest* 1985; 15(2): 95–9.

**11 PRILOGE**

## 11.1 TABELE PARAMETROV HEMOGRAMA

Tabela 1: Levkociti (povprečje  $\pm$  SEM  $10^3/\text{mm}^3$ )

$10^3/\text{mm}^3$	Obrite	Odlakane	Kontrola	p-vrednost
0 dni	7,63 $\pm$ 0,4	8,41 $\pm$ 0,62	8,36 $\pm$ 0,54	1
7 dni	7,84 $\pm$ 0,59	7,31 $\pm$ 0,44	6,98 $\pm$ 0,34	1
30 dni	8,14 $\pm$ 0,42	7,757 $\pm$ 0,48	7,28 $\pm$ 0,32	0,86
60 dni	7,92 $\pm$ 0,41	8,4 $\pm$ 0,49	7,48 $\pm$ 0,34	1
p-vrednost	1	0,07	0,2	

Tabela 2: Eritrociti (povprečje  $\pm$  SEM  $10^6/\text{mm}^3$ )

$10^6/\text{mm}^3$	Obrite	Odlakane	Kontrola	p-vrednost
0 dni	6,78 $\pm$ 0,24	6,89 $\pm$ 0,21	6,77 $\pm$ 0,15	1
7 dni	6,37 $\pm$ 0,16	6,49 $\pm$ 0,17	6,49 $\pm$ 0,16	1
30 dni	6,42 $\pm$ 0,16	6,68 $\pm$ 0,21	6,49 $\pm$ 0,18	1
60 dni	6,66 $\pm$ 0,11	6,66 $\pm$ 0,18	6,52 $\pm$ 0,156	1
p-vrednost	0,23	0,2	0,29	

Tabela 3: Hemoglobin (povprečje  $\pm$  SEM g/dL)

g/dL	Obrite	Odlakane	Kontrola	p-vrednost
0 dni	9,81 $\pm$ 0,36	9,9 $\pm$ 0,26	9,54 $\pm$ 0,17	1
7 dni	9,24 $\pm$ 0,23	9,31 $\pm$ 0,21	9,32 $\pm$ 0,17	1
30 dni	9,24 $\pm$ 0,19	9,3 $\pm$ 0,25	9,19 $\pm$ 0,18	1
60 dni	6,58 $\pm$ 0,22	9,33 $\pm$ 0,23	9,42 $\pm$ 0,14	1
p-vrednost	0,35	0,04	1	

Tabela 4: Hematokrit (povprečje  $\pm$  SEM %)

%	Obrite	Odlakane	Kontrola	p-vrednost
0 dni	31,4 $\pm$ 1,22	31,79 $\pm$ 0,95	30,59 $\pm$ 0,57	1
7 dni	29,04 $\pm$ 0,77	29 $\pm$ 0,69	29,13 $\pm$ 0,62	1
30 dni	29,25 $\pm$ 0,62	29,33 $\pm$ 0,89	28,96 $\pm$ 0,65	1
60 dni	29,99 $\pm$ 0,76	28,77 $\pm$ 0,84	29,13 $\pm$ 0,52	0,75
p-vrednost	0,23	0,009	0,17	

Tabela 5: Povprečna prostornina eritrocitov (povprečje  $\pm$  SEM  $\mu\text{m}^3$ )

$\mu\text{m}^3$	Obrite	Odlakane	Kontrola	p-vrednost
0 dni	46,31 $\pm$ 0,87	46,29 $\pm$ 1,07	45,35 $\pm$ 0,84	1
7 dni	45,65 $\pm$ 0,85	44,81 $\pm$ 1,06	45 $\pm$ 0,76	1
30 dni	45,82 $\pm$ 0,92	44,14 $\pm$ 1,05	45,06 $\pm$ 0,85	1
60 dni	45,06 $\pm$ 0,91	43,36 $\pm$ 1,03	44,94 $\pm$ 0,85	1
p-vrednost	1	0,003	1	

Tabela 6: Povprečna količina hemoglobina v eritrocitih (povprečje  $\pm$  SEM pg)

pg	Obrite	Odlakane	Kontrola	p-vrednost
0 dni	14,5 $\pm$ 0,25	14,45 $\pm$ 0,33	14,15 $\pm$ 0,28	1
7 dni	14,52 $\pm$ 0,26	14,43 $\pm$ 0,34	14,43 $\pm$ 0,27	1
30 dni	14,45 $\pm$ 0,31	14,01 $\pm$ 0,35	14,26 $\pm$ 0,27	1
60 dni	14,37 $\pm$ 0,26	14,06 $\pm$ 0,3	14,51 $\pm$ 0,27	1
p-vrednost	1	0,53	0,16	

Tabela 7: Povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitih (povprečje  $\pm$  SEM g/dL)

g/dL	Obrite	Odlakane	Kontrola	p-vrednost
0 dni	31,31 $\pm$ 0,15	31,19 $\pm$ 0,17	31,21 $\pm$ 0,14	1
7 dni	31,84 $\pm$ 0,11	32,13 $\pm$ 0,19	32,03 $\pm$ 0,18	1
30 dni	31,56 $\pm$ 0,14	31,81 $\pm$ 0,15	31,77 $\pm$ 0,15	1
60 dni	31,93 $\pm$ 0,18	32,48 $\pm$ 0,18	32,36 $\pm$ 0,16	0,196
p-vrednost	0,036	0,00000025	0,000025	

## 11.2 TABELE VREDNOSTI DIFERENCIALNE BELE KRVNE SLIKE

Tabela 8: Odstotek nevtrofilnih granulocitov (povprečje  $\pm$  SEM %)

%	Obrite	Odlakane	Kontrola	p-vrednost
0 dni	45,19 $\pm$ 3,33	49,94 $\pm$ 2,14	45,12 $\pm$ 3,85	1
7 dni	51,41 $\pm$ 2,65	45,44 $\pm$ 1,9	44,18 $\pm$ 2,8	0,67
30 dni	51,47 $\pm$ 2,2	50 $\pm$ 1,93	48,81 $\pm$ 3,54	1
60 dni	47,69 $\pm$ 2,65	48,57 $\pm$ 3,01	46,35 $\pm$ 3,5	1
p-vrednost	0,28	0,75	1	

Tabela 9: Odstotek limfocitov (povprečje  $\pm$  SEM %)

%	Obrite	Odlakane	Kontrola	p-vrednost
0 dni	48,06 $\pm$ 2,97	42,65 $\pm$ 2,31	48,41 $\pm$ 4,16	1
7 dni	42,41 $\pm$ 2,52	49,56 $\pm$ 1,99	50,12 $\pm$ 2,95	0,316
30 dni	42,47 $\pm$ 2,85	44,93 $\pm$ 2,17	45,56 $\pm$ 3,41	1
60 dni	45,31 $\pm$ 2,64	43,93 $\pm$ 2,91	44,88 $\pm$ 3,72	1
p-vrednost	0,393	0,24	0,69	



Tabela 10: Odstotek eozinofilnih granulocitov (povprečje  $\pm$  SEM %)

%	Obrite	Odlakane	Kontrola	p-vrednost
0 dni	3,88 $\pm$ 0,83	2,47 $\pm$ 0,51	3,06 $\pm$ 0,75	1
7 dni	3,65 $\pm$ 0,75	2,75 $\pm$ 0,62	3,24 $\pm$ 0,68	1
30 dni	2,24 $\pm$ 0,64	2,29 $\pm$ 0,49	2,5 $\pm$ 0,53	1
60 dni	3,88 $\pm$ 0,67	3,5 $\pm$ 0,99	4,29 $\pm$ 0,68	1
p-vrednost	0,57	1	0,69	

Tabela 11: Odstotek bazofilnih granulocitov (povprečje  $\pm$  SEM %)

%	Obrite	Odlakane	Kontrola	p-vrednost
0 dni	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0,059 $\pm$ 0,059	1
7 dni	0,059 $\pm$ 0,059	0 $\pm$ 0	0,059 $\pm$ 0,059	1
30 dni	0,12 $\pm$ 0,081	0 $\pm$ 0	0,19 $\pm$ 0,1	0,82
60 dni	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0,24 $\pm$ 0,14	0,34
p-vrednost	0,58	/	0,49	

Tabela 12: Odstotek monocitov (povprečje  $\pm$  SEM %)

%	Obrite	Odlakane	Kontrola	p-vrednost
0 dni	2,31 $\pm$ 0,45	3,12 $\pm$ 0,73	2,59 $\pm$ 0,7	1
7 dni	2,35 $\pm$ 0,94	2,19 $\pm$ 0,61	2,35 $\pm$ 0,56	1
30 dni	3,06 $\pm$ 0,64	2,64 $\pm$ 0,49	2,56 $\pm$ 0,58	1
60 dni	3 $\pm$ 0,47	3,71 $\pm$ 0,62	4,06 $\pm$ 0,78	1
p-vrednost	1	0,67	0,8	

Tabela 13: Odstotek paličastih nevtrofilnih granulocitov (povprečje  $\pm$  SEM %)

%	Obrite	Odlakane	Kontrola	p-vrednost
0 dni	0,5 $\pm$ 0,02	1,29 $\pm$ 0,51	0,82 $\pm$ 0,37	1
7 dni	0,059 $\pm$ 0,059	0 $\pm$ 0	0,059 $\pm$ 0,059	1
30 dni	0,059 $\pm$ 0,059	0,07 $\pm$ 0,07	0,31 $\pm$ 0,15	0,81
60 dni	0 $\pm$ 0	0,21 $\pm$ 0,11	0,18 $\pm$ 0,13	1
p-vrednost	0,069	0,14	0,26	

## 11.3 TABELE VREDNOSTI BIOKEMIJSKIH PARAMETROV

Tabela 14: Vrednost celokupnega kalcija (povprečje  $\pm$  SEM Mmol/L)

Mmol/L	Obrite	Odlakane	Kontrola	p-vrednost
0 dni	2,43 $\pm$ 0,029	2,45 $\pm$ 0,035	2,46 $\pm$ 0,034	1
7 dni	2,43 $\pm$ 0,028	2,44 $\pm$ 0,037	2,47 $\pm$ 0,024	1
30 dni	2,37 $\pm$ 0,027	2,39 $\pm$ 0,038	2,32 $\pm$ 0,031	1
60 dni	2,54 $\pm$ 0,32	2,59 $\pm$ 0,042	2,53 $\pm$ 0,034	1
p-vrednost	0,00061	0,001	0,00000059	

Tabela 15: Vrednosti anorganskega fosforja (povprečje  $\pm$  SEM Mmol/L)

Mmol/L	Obrite	Odlakane	Kontrola	p-vrednost
0 dni	1,93 $\pm$ 0,06	1,99 $\pm$ 0,05	2,1 $\pm$ 0,06	0,9
7 dni	1,88 $\pm$ 0,05	1,88 $\pm$ 0,06	1,94 $\pm$ 0,07	1
30 dni	1,89 $\pm$ 0,03	1,85 $\pm$ 0,04	1,86 $\pm$ 0,05	1
60 dni	1,91 $\pm$ 0,04	1,86 $\pm$ 0,06	2 $\pm$ 0,06	0,74
p-vrednost	1	0,11	0,0011	

Tabela 16: Vrednosti glutamat dehidrogenaze (povprečje  $\pm$  SEM U/L)

U/L	Obrite	Odlakane	Kontrola	p-vrednost
0 dni	16,4 $\pm$ 2,6	39,83 $\pm$ 19,83	15,53 $\pm$ 1,4	0,65
7 dni	15,75 $\pm$ 1,4	19,34 $\pm$ 2,37	21,04 $\pm$ 5,16	0,63
30 dni	18,91 $\pm$ 2,24	26,51 $\pm$ 2,8	21,02 $\pm$ 2,73	0,65
60 dni	15,06 $\pm$ 1,25	19,43 $\pm$ 1,81	16,53 $\pm$ 2,14	0,99
p-vrednost	0,79	0,89	0,1	

Tabela 17: Vrednosti gama glutamil transferaze (povprečje  $\pm$  SEM U/L)

U/L	Obrite	Odlakane	Kontrola	p-vrednost
0 dni	19,22 $\pm$ 2,03	22,71 $\pm$ 2,69	23,06 $\pm$ 2,1	0,57
7 dni	22,65 $\pm$ 1,83	25,12 $\pm$ 2,39	22,53 $\pm$ 2,06	1
30 dni	27,76 $\pm$ 1,63	25,21 $\pm$ 2,47	26,75 $\pm$ 1,69	1
60 dni	26,56 $\pm$ 1,1	29 $\pm$ 3,01	26,65 $\pm$ 2,25	1
p-vrednost	0,003	0,021	0,0011	

## 11.4 MNENJE KOMISIJE ZA DOBROBIT ŽIVALI NA VETERINARSKI FAKULTETI

Univerza  
v Ljubljani  
Veterinarska  
fakulteta

Corbičeva 60  
1000 Ljubljana, Slovenija  
telefon 01 47 79 100  
faks 01 28 32 243  
dokumat@vf.uni-lj.si

izr. prof. dr. Jelka Zabavnik Piano,  
strokovnjakinja za dobrobit živali v poskusu na VF,  
predsednica Komisije za dobrobit živali na VF  
Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani



Ljubljana, 25.3.2020

Komisija za podiplomski študij  
Veterinarska fakulteta

**Zadeva: Mnenje o potrebi po pridobitvi dovoljenja za poskus na živalih za predlagano študijo**

Izr. prof. dr. Jože Starič in Jaka Jakob Hodnik sta na Komisijo za dobrobit živali na veterinarski fakulteti dne 18.3.2020 posredovala dopis za presojo, ali gre v primeru predlaganega proučevanja v študiji z naslovom »Vpliv obsevanja z UVB na sintezo vitamina D, njegovo sezonsko nihanje ter vpliv na zdravje in prirejo krav molznic« za poskus na živalih ali zdravljenje oziroma ustaljeno rejsko prakso, ki se izvaja pri živalih.

Predlagatelja študije navajata, da bodo pri kravah molznicah preučevali vpliv UVB sevanja na proizvodnjo vitamina D v koži. Kravam bodo v času molže v molznem robotu obsevali hrbet z UVB svetlobo ozkega spektra. Ocenjujejo, da bo ta količina svetlobe zadostila dnevnim potrebam za sintezo vitamina D krav molznic črno bele pasme. Odmerek UVB sevanja, kateremu bodo krave izpostavljene, ne bo presegal odmerka, ki bi ga na sončen poletni dan krave prejele na paši. Nekaj krav bodo tudi obrili za določitev vpliva dlake. Raven proizvodnje vitamina D bodo spremljali z merjenjem 25-hidroksi-vitamina D v krvnih vzorcih, ki bodo odvzeti 4-krat v obdobju 2 mesecev. Vzorci bodo pridobljeni v okviru rednega določanja presnovnega profila krav molznic na kmetiji. Predlagatelja navajata, da je določanje presnovnega profila rutinsko veterinarsko orodje za presimptomatsko ugotavljanje presnovnih bolezni, uporablja pa se tudi za ugotavljanje optimalne nutritivne oskrbe krav. Predlagatelja navajata, da se pregled presnovnega profila priporoča, ko se spremeni obrok za krave molznice, vključno s pašo. Zaradi povečanja mlečne proizvodnje in s tem povečane incidence presnovnih obolenj, je presnovni profil postal nepogrešljivo rutinsko orodje veterinarjev, nutricionistov in rejcev v intenzivnih rejah krav molznic.

Zakon o zaščiti živali (Uradni list RS 38/2013) v 21 a. členu definira, da za poskus na živali ne štejejo neeksperimentalne klinične veterinarske prakse. V predlaganem programu dela gre primarno za preverjanje zdravstvenega stanja krav molznic na željo lastnika živali s standardno obliko vzorčenja, oziroma za zagotavljanje zdravja živali. Lastnik se strinja, da se odvzeti vzorci krvi uporabijo tudi za opisano študijo, kar je razvidno iz pisne izjave lastnika krav. Pravilnik o pogojih za izvajanje poskusov na živalih v 3. členu določa, da je poskus na živali uporaba poskusne živali v poskusne namene, ki lahko živali povzročijo trpljenje, stisko ali trajne poškodbe, enakovredne ali hujše od vboda igle. V okviru študije bod tudi določali minimalni odmerek UVB sevanja, ki je potreben za povzročitev rdečine (Minimal Erythema Dose - MED) na obriti ali neobriti koži pri kravah. Ocenjujemo, da ta postopek povzroča manjšo bolečino in nelagodje kot vbod z iglo.

Člani Komisije za dobrobit živali na VF so soglasno ocenili (korespondenčna seja, ki je potekala 19.3.2020), da v primeru predlagane študije ne gre za poskus na živali, kjer bi bilo potrebno pridobiti dovoljenje za delo z

živalmi, temveč za preverjanje zdravstvenega stanja živali na zahtevo lastnika in neinvazivni postopek določanja minimalnega odmerka UVB sevanja, ki je potreben za povzročitev rdečine (Minimal Erythema Dose - MED) pri kravah. Določanje MED z opisanim postopkom ne dosega stopnje bolečine ali nelagodja živali, ki bi bila enaka ali večja kot pri vbodu z iglo.

Lep pozdrav



izr. prof. dr. Jelka Zabavnik Piano, I.r.  
strokovnjakinja za dobrobit živali v poskusu na VF  
predsednica Komisije za dobrobit živali na VF

Priloge:  
Obrazec Č  
Obrazložitev za Komisijo za dobrobit živali

V vednost: izr. prof. dr. Jože Starič, Jaka Jakob Hodnik