

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

**VPLIV STRESA PRI NOVOROJENIH TELETIH NA
KVALITETO NJIHOVEGA SEMENA PO NASTOPU
SPOLNE ZRELOSTI**

**THE INFLUENCE OF STRESS IN NEWBORN CALVES
ON THEIR SEMEN QUALITY AFTER SEXUAL
MATURITY**

Kaja Blažič, Nika Šehić

Ljubljana, 2019

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK

636.2.083.14+636.083.31:612.72:577.175.5:612.01.616(043.2)

**VPLIV STRESA PRI NOVOROJENIH TELETIH NA
KVALITETO NJIHOVEGA SEMENA PO NASTOPU SPOLNE
ZRELOSTI**

**THE INFLUENCE OF STRESS IN NEWBORN CALVES ON
THEIR SEMEN QUALITY AFTER SEXUAL MATURITY**

Kaja Blažič, Nika Šehić

Delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom, pod mentorstvom izr. prof. dr. Tomaža Snoja in somentorstvom prof. dr. Gregorja Majdiča na Inštitutu za predklinične vede Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Ljubljana, 2019

POVZETEK

Ključne besede: reprodukcija – fiziologija – veterinarska; reja – metode; fiziološki stres; analiza sperme; hidrokortizon – metabolizem; dlake – kemija; socialno vedenje; govedo; samec

Namen dela je bil ugotoviti vpliv načina reje mladih bikov v času zgodnjega obdobja po rojstvu na njihovo reprodukcijsko sposobnost v odraslem obdobju. Poleg tega smo z določanjem koncentracije kortizola v dlaki ovrednotili stres v primeru zgodnje ločitve telet od mater.

Prvi del raziskave predstavlja primerjavo telesne mase in kvalitete semena bikov, ki po rojstvu niso imeli stika z materami in so prejeli mlečni nadomestek ali mleko preko napajalnikov, z biki, ki so do starosti dva meseca bili v stiku z materami in so pri njih sesali. Rezultati kažejo, da so štirimesečni biki, ki so bili v stiku z materami, imeli statistično značilno večjo telesno maso kot njihovi vrstniki, ki so bili takoj po rojstvu ločeni od mater. Prav tako so biki, ki so bili kot teleta v stiku z materami, imeli pri starosti dveh do štirih let statistično značilno večji volumen ejakulata in večje število semenčic v ejakulatu.

V drugem delu raziskave smo ugotavljali, če lahko ovrednotimo stres, ki ga predstavlja zgodnja ločitev telet od mater, z merjenjem ravni stresnega hormona kortizola v dlaki. Koncentracijo kortizola smo določili pri teletih, ki so bila vsaj dva meseca v stiku z materami in so sesala pri njih, in teletih, ki so bila po rojstvu ločena od mater. Med skupinami nismo ugotovili statistično značilnih razlik.

V raziskavi je prvič opisan vpliv zgodnjega postnatalnega stresa na parametre kvalitete semena odraslih bikov.

ABSTRACT

Key Words: reproduction – physiology – veterinary; breeding – methods; stress, physiological; semen analysis; hydrocortisone – metabolism; hair – chemistry; social behavior; cattle; male

The aim of the study was to evaluate the impact of early postnatal breeding conditions on semen parameters in adulthood. In addition, early cow-calf separation as a stressor in calves was evaluated by determination of hair cortisol concentration.

In the first part of the study, body weight and semen parameters were compared between bulls which were separated from their mothers first day after parturition and bulls which remained with their mothers until two months of age. The results have shown that body weight of maternally non-separated bulls at the age of 4 months was significantly higher. Additionally, ejaculate volume and total sperm output were significantly higher at maternally non-separated bulls.

In the second part of the studies we evaluated whether stress caused by early cow-calf separation could be determined by measuring hair cortisol concentrations in maternally separated and non-separated calves. No significant differences were found between groups.

This is one of the first study where the impact of early postnatal stress on reproductive quality parameters of adult bulls was described.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	7
1.1	OPREDELITEV PROBLEMA	7
1.2	CILJI RAZISKOVANJA	8
1.3	DELOVNE HIPOTEZE	8
2	PREGLED LITERATURE.....	9
2.1	FIZIOLOŠKE OBLIKE STRESA	9
2.2	VPLIV STRESA NA ORGANIZEM.....	10
2.3	ODSTAVITEV KOT STRESNI DEJAVNIK	11
2.4	OCENA STOPNJE STRESA.....	12
3	MATERIAL IN METODE DELA	16
3.1	ŽIVALI V RAZISKAVI.....	16
3.1.1	Odrasli plemenski biki rjave pasme	16
3.1.2	Teleta	16
3.2	METODE	17
3.2.1	Določanje telesne mase, prirasta in obsega mod.....	17
3.2.2	Določanje parametrov semena	17
3.2.3	Odvzem vzorcev dlake	18
3.2.4	Ekstrakcija kortizola iz dlake	19
3.3	STATISTIČNA ANALIZA	19
4	REZULTATI.....	21
4.1	TELESNA MASA, POVPREČNI DNEVNI PRIRAST IN OBSEG MOD	21
4.2	PARAMETRI KVALITETE SEMENA	25
4.3	OCENA STRESA Z UGOTAVLJANJEM KONCENTRACIJE KORTIZOLA V DLAKI	28
5	RAZPRAVA	30
5.1	TELESNA MASA.....	30
5.2	VPLIV ZGODNJE LOČITVE BIKCEV OD MATERE NA PARAMETRE SEMENA	32
5.3	OCENA STRESA Z UGOTAVLJANJEM KONCENTRACIJE KORTIZOLA V DLAKI	34
6	SKLEPI.....	36
7	ZAHVALA.....	37
8	LITERATURA.....	38

KAZALO TABEL

Tabela 1: Število bikov in analiziranih ejakulatov glede na starost in stik z materjo	18
---	----

KAZALO SLIK

Slika 1: Telesna masa telet ob prihodu v vzrejališče.....	21
Slika 2: Telesna masa bikov pri starosti eno leto	22
Slika 3: Povprečni dnevni prirast (g).....	23
Slika 4: Obseg mod pri starosti eno leto.....	24
Slika 5: Volumen ejakulata (ml).....	25
Slika 6: Koncentracija semenčic ($\times 10^9/\text{ml}$)	26
Slika 7: Število semenčic v ejakulatu ($\times 10^9$).....	27
Slika 8: Koncentracija kortizola v dlaki teličk (ng/g).....	28
Slika 9: Koncentracija kortizola v dlaki bikcev (ng/g).....	29

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

11 β HSD	11 β -hidroksisteroid dehidrogenaza; 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase
ACTH	adrenokortikotropni hormon; adrenocorticotropic hormone
AP	alkalna fosfataza; alkaline phosphatase
BHBA	β -hidroksimaslena kislina; β -hydroxybutyric acid
CK	kreatin kinaza; creatine kinase
CRH	kortikotropin sproščujoči hormon; corticotropin-releasing hormone
FSH	folikel stimulirajoči hormon; follicle stimulating hormone
GnRH	gonadotropin sproščujoči hormon; gonadotropin-releasing hormone
os HPA	os hipotalamus-hipofiza-nadledvična žleza; hypothalamic-pituitary-adrenal axis
os HPG	os hipotalamus-hipofiza-gonade; hypothalamic-pituitary-gonadal axis
KGZS	Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije; The Chamber of Agriculture and Forestry of Slovenia (CAFS)
LDH	laktat dehidrogenaza; lactate dehydrogenase
LH	luteinizirajoči hormon; luteinizing hormone
NEFA	neesterificirane maščobne kisline; non-esterified fatty acids
Rpm	obrati na minuto; rounds per minute

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Stres je odziv organizma na močne ali dolgotrajne zunanje in notranje moteče in obremenjujoče dražljaje (stresorje), na katere organizem ni prilagojen (Brglez in sod., 2013). Zaradi delovanja stresorjev se v organizmu sprožijo reakcije, ki omogočijo prilagajanje na prisotnost obremenjujočih dražljajev. Prvi odziv na stres ureja simpatični živčni sistem s povečanim izločanjem adrenalina, ki povzroči kratkotrajne učinke, kot so intenzivnejše delovanje srca, povečan pretok krvi v skeletnih mišicah, dvig krvnega pritiska in širjenje dihalnih poti. Nadalje stresni dejavniki lahko povzročijo aktivacijo osi hipotalamus-hipofiza-nadledvična žleza (HPA) in s tem povečano tvorbo in izločanje kortikotropin sproščujočega hormona (CRH) iz hipotalamusa, adrenokortikotropnega hormona (ACTH) iz hipofize ter glukokortikoidov (kortizola in kortikosterona) iz nadledvične žleze. Povečana tvorba glukokortikoidov je značilnost stresnega odgovora organizma (Mormede in sod., 2007).

Stresni odziv omogoča adaptacijo organizma na delovanje stresorjev. Če stresni dejavniki presežejo prag sposobnosti adaptacije na stres, se organizem ni več v celoti sposoben prilagoditi negativnim vplivom okolja. Žival posledično ne more izraziti svojega genetskega potenciala za proizvodne lastnosti, kot so na primer intenzivnost rasti in nivo mlečnosti, poleg tega oslabi imunski odgovor, poslabša pa se tudi plodnost (Dobson in Smith, 2000).

Stres v prvih dneh življenja pomembno vpliva na razvoj in kasnejše vedenje živali in ljudi. Raziskave kažejo, da zgodnji stik matere in otroka dolgotrajno vpliva na vedenje obeh (Salariya in sod., 1978; Widström in sod., 1990). Na modelu laboratorijskih glodavcev je bilo ugotovljeno, da je v zgodnjem postnatalnem obdobju tvorba glukokortikoidov razmeroma nizka, kar je pogoj za nemoten razvoj osrednjega živčevja. Izpostavljenost stresu in s tem visoka koncentracija glukokortikoidov v tem obdobju upočasnijo mielinizacijo nevronov in zmanjša proliferacijo celic v hipokampusu (Gould in sod., 1997; Takase in sod., 2012). Posledice delovanja stresa v zgodnjem življenjskem obdobju so zato lahko dolgotrajne, saj hipokampus ureja aktivnost osi HPA (Weaver, 2007). Visoka koncentracija kortizola vpliva na delovanje osi hipotalamus-hipofiza-gonade (HPG), kar se lahko odraža z zmanjšano plodnostjo (Geraghty in Kaufer, 2015; Retana-Marquez in sod., 2003).

V čredah, ki se ukvarjajo s tržno prirejo mleka, teleta pogosto ločijo od mater že prvi dan po telitvi in jih napajajo z mlekom oziroma mlečnim nadomestkom. Ločitev telet od mater tako za teleta, kot za krave predstavlja stres, ki ima lahko dolgotrajne posledice (Enriquez in sod., 2011; Wagner in sod., 2015).

1.2 CILJI RAZISKOVANJA

Cilj naše raziskave je bil ugotoviti vpliv načina reje v času zgodnjega življenjskega obdobja mladih plemenskih bikov (telet)- potomcev načrtnega parjenja bikovskih mater z elitnimi biki na prirast in kvaliteto njihovega semena v odraslem obdobju. Poleg tega smo želeli ugotoviti, ali lahko stres, ki ga povzroči zgodnja ločitev od matere, določimo z merjenjem koncentracije kortizola v dlaki.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

V okviru naše raziskave smo postavili naslednji hipotezi:

- Plemenski biki, ki so kot teleta bili v stiku z materami vsaj dva meseca po rojstvu in pri njih sesali, imajo večjo telesno maso in boljšo kvaliteto semena od tistih bikov, ki so bili kot teleta takoj po rojstvu ločeni od mater.
- Teleta, ki so bila po rojstvu vsaj dva meseca v stiku z materami, imajo v dlaki nižjo raven kortizola od telet, ki so bila takoj po rojstvu ločena od mater.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 FIZIOLOŠKE OBLIKE STRESA

Številni vplivi okolja predstavljajo stresni dejavnik oziroma stresor. Organizem se na vpliv stresnih dejavnikov odzove s stresnim odgovorom, kar so procesi, katerih namen je ohranitev notranjega ravnovesja (Hardy in sod., 2005). Odziv na stres ureja os HPA. Ob zaznavi stresa se iz hipotalamusa izloči CRH, ki preko portalnega krvnega obtoka preide v hipofizo, kjer sproži izločanje ACTH, ta pa v skorji nadledvične žleze (predvsem v coni fascikulati) povzroči izločanje glukokortikoidnih hormonov. Glavna glukokortikoidna hormona sta kortizol in kortikosteron, ki sta si po kemični zgradbi med seboj zelo podobna, sta pa različno pomembna pri različnih živalskih vrstah. Pri laboratorijskih živalih (miši, podgane) je tako glavni glukokortikoid kortikosteron, pri ljudeh in večini domačih živali, vključno z govedom, pa je glavni glukokortikoid kortizol (Brown, 1994).

Stres delimo na distres in eustres. Distres opredeljujemo kot stres, ki ima negativne posledice za organizem (Webster, 1983). Organizem se zaradi distresa ne more prilagoditi na novonastalo stanje (Broom, 2003). Eustres pa ima za organizem nevtralne ali pozitivne posledice (Trevisi in Bertoni, 2009).

Glede na dolžino trajanja stres delimo na akutni in kronični. Akutni stres je posledica kratkotrajnega delovanja stresorja na organizem. Stresni odgovor nastane hitro in traja kratek čas (Trevisi in Bertoni, 2009). V tem času v organizmu potekajo procesi, ki omogočijo adaptacijo na stres. V prvi fazi se pod vplivom simpatičnega živčnega sistema iz sredice nadledvične žleze v krvni obtok sprosti adrenalin, ki pospeši frekvenco srca ter poveča njegov udarni volumen. Obenem adrenalin povzroči širjenje dihalnih poti in mobilizacijo glukoze iz zalog glikogena, s tem pa žival pripravi na 'beg ali boj'. V naslednjem koraku se poveča aktivnost osi HPA in povečano izločanje glukokortikoidnih hormonov, kortizola ali kortikosterona. Pod vplivom glukokortikoidov se med adaptacijo na stres iz glikogena sprošča glukoza. Če se zaloge glikogena porabijo, se pojavijo procesi, ki zmanjšajo produkcijske in reprodukcijske sposobnosti živali. Zaradi vpliva visoke koncentracije glukokortikoidov na os HPG, se izloča manj gonadotropinov, kar vpliva na reprodukcijske funkcije (Matteri in sod., 2000).

Zaradi dolgotrajnega delovanja stresnih dejavnikov na organizem se pojavi kronični stres. Kot posledica kroničnega stresa lahko nastanejo trajne spremembe v delovanju endokrinega in imunskega sistema (Matteri in sod., 2000; Trevisi in Bertoni, 2009).

2.2 VPLIV STRESA NA ORGANIZEM

Ko je presežen prag sposobnosti adaptacije na stresne dejavnike, se v organizmu pojavijo negativni učinki stresa. Tako Dobson in Smith (2000) v svoji študiji ugotavljata, da stres omejuje učinkovitost reprodukcije preko regulatornih točk endokrinega sistema. Stresorji motijo precizno izločanje hormonov med folikularno fazo spolnega ciklusa. Ugotovljeno je bilo, da transport živali zmanjša frekvenco in amplitudo izločanja gonadotropin sproščujočega hormona (GnRH) in posledično LH pulzov. Zaradi tega se spremeni učinek LH. Phogat in sod. (1999) so s poskusom dokazali, da intravenozno aplicirani ACTH ali transport zmanjšata količino izločenega GnRH in LH. Manjše izločanje GnRH vpliva na počasnejšo rast foliklov v jajčnikih in posledično na slabšo reprodukcijsko sposobnost (Dobson in Smith, 2000).

Stres vpliva tudi na moške spolne organe. Androgeni hormoni v največji meri nastajajo v leydigovih celicah mod. Ob izpostavljenosti stresnim dejavnikom se poveča tvorba glukokortikoidov, kar zavira in moti signalizacijo preko osi HPG, saj je izločanje LH zavirto. Posledica tega je zmanjšano izločanje testosterona, kar vodi do zmanjšane libida in upada plodnosti (Geraghty in Kaufer, 2015; Retana-Marquez in sod., 2003). Fenster in sod. (1997) opisujejo, da hud psihološki stres, kot je na primer smrt sorodnika ali partnerja, pri ljudeh zmanjša koncentracijo semenčic v ejakulatu. Najverjetneje je to posledica znižane koncentracije testosterona. Številni podatki kažejo, da tudi direkten vpliv glukokortikoidov na leydigove celice igra pomembno vlogo pri reprodukcijski sposobnosti samcev. Količina testosterona v krvi je odvisna od skupnega števila in sposobnosti steroidogeneze leydigovih celic. Glukokortikoidi pri glodavcih neposredno zavirajo izražanje genov, ki kodirajo encime, udeležene pri biosintezi testosterona. Poleg tega vplivajo tudi na skupno število leydigovih celic, saj izzovejo njihovo apoptozo. Ugotovljeno je bilo tudi, da prenatalni stres in stres v zgodnjem obdobju pubertete zaradi zaviranja mitoze privedeta do manjšega števila leydigovih celic pri glodavcih (Hardy in sod., 2005).

Delovanje glukokortikoidov v leydigovih celicah uravnava tudi encim 11β -hidroksisteroid dehidrogenaza (11β HSD), ki biološko aktivni kortizol pretvarja v neaktivni kortizol. Če je koncentracija glukokortikoidov nizka, 11β HSD inaktivira kortizol in njegova vezava na receptorje je minimalna. V stresnih situacijah pa koncentracija glukokortikoidov presega katalitično kapaciteto 11β HSD. Posledično ne pride do zadostne inaktivacije glukokortikoidov in ti lahko negativno vplivajo na delovanje leydigovih celic (Hardy in sod., 2005).

Številne študije so pokazale, da ima stres v zgodnjem življenjskem obdobju velike in dolgotrajne posledice na razvijajoči se živčni sistem. Prve dni življenja (4-14 dni) podgane izražajo zmanjšan odziv na stres (obdobje zmanjšane odzivnosti) (Sapolsky in Meaney, 1986). Nizka tvorba kortikosterona v tem obdobju je pogoj za razvoj osrednjega živčevja (Shoenfield in sod., 1980; Barbazanges in sod., 1996). Izpostavljenost visokim koncentracijam glukokortikoidov v zgodnjem postnatalnem obdobju lahko povzroči poškodbe celic, zavira mielinizacijo nevronov in zavira proliferacijo celic v hipokampusu (Gould in sod., 1997; Takase in sod., 2012). Prav tako so številne študije na laboratorijskih glodavcih pokazale, da ima zgodnja ločitev od matere vpliv na spremenjeno vedenje in nevroendokrine odzive v odrasli dobi. Zgodnja ločitev od matere (ko so živali v obdobju zmanjšane odzivnosti na stresne dejavnike) vpliva tudi na stresni odgovor živali v odraslosti, saj zgodnji postnatalni stres trajno vpliva na os HPA. Posledično imajo živali višje vrednosti bazalnega ACTH in slabši odziv na stres v odrasli dobi (Daniels in sod., 2004). Zgodnja ločitev od matere tudi poveča anksiozno vedenje in vpliva na kognitivne funkcije pri podganah in miših (Veenema in sod., 2006; Veenema in sod., 2007; Takase in sod., 2012; Mc Ewen, 2018). Liu in sod. (1997) so v svoji študiji ugotavljali vpliv zgodnje ločitve od matere na koncentracijo semenčic, težo spolnih organov, pravilnost ciklusa in število mladičev pri podganah. Pri samicah ni bilo statistično značilnih razlik med skupinama. Pri samcih pa so bila moda za 8 % lažja pri živalih, ki so bile v zgodnjem obdobju življenja začasno ločene od mater. Bodensteiner in sod. (2014) v svoji študiji poročajo o zakasneli puberteti in nižjih vrednostih testosterona pri podganjih samcih, ki so bili v prvih dneh življenja občasno ločeni od mater.

2.3 Odstavitev kot stresni dejavnik

V naravi je preživetje telet odvisno od močne in trajne vezi z materjo. Povezava mladiča in matere se izraža kot pripadnost. Krava tele liže, hrani, mu nudi toploto in zaščito, skupaj

počivata in usklajujeta aktivnosti. Vež med kravo in teletom se oblikuje in ostaja prisotna ne glede na to, kako dolgo je tele sesalo (Johnsen in sod., 2015).

V ekstenzivnih rejah krav do jilj so teleta v stiku z materami do starosti pol leta ali celo več, v intenzivnih rejah krav molznic pa teleta ločijo od mater že nekaj urah po telitvi. Zgodnja ločitev telet od mater je nenaravna in problematična, saj predstavlja stres tako za kravo kot za tele. Odsotnost matere in sesanja ter spremembe v socialnem in fizičnem okolju za novorojeno tele predstavljajo stres. Nenadna odstavitev povzroči dvig plazemskega adrenalina in kortizola. Poviša se tudi koncentracija proteinov akutne faze, število nevtrofilcev in limfocitov, zmanjša pa se imunski odziv (Enriquez in sod., 2011). V nasprotnem primeru je ugotovljeno, da sesanje izboljša zdravje in dobro počutje (Johnsen in sod., 2015). Lidfors (1996) ter Flower in Weary (1999) v svojih raziskavah ugotavljajo, da se teleta, ki po rojstvu ostanejo s kravami, hitreje postavijo na noge in bolje priraščajo.

Stalen stik krave s teletom omogoča naravne pogoje in izražanje materinskega vedenja, ima pa s stališča sodobne govedoreje tudi določene pomanjkljivosti. Ko pride do odstavitve, se lahko pojavi stanje akutnega stresa. Tudi nenadna sprememba načina prehranjevanja pri teletih lahko povzroči motnje v prebavi in izgubo telesne mase. Če je tele ves čas ob kravi, se med teletom in človekom razvije manj intenziven odnos, saj imata manj kontakta, to pa vodi v slabšo socializacijo živali. Tem težavam se lahko izognemo s polovičnim dnevnim sistemom, ko je tele v stiku z materjo le polovico dneva. V primerjavi s teleti, ki niso v stiku z materami, ta teleta zaužijejo več mleka, imajo boljši prirast in razvijejo vez s človekom. Ugotovljeno je, da je med telicami, ki so zaužile več mleka v času do odstavitve, manjši delež pred puberteto izločenih živali, v prvi laktaciji pa imajo večjo mlečnost. Poleg tega je bil pri takih živalih manjši indeks osemenitev (število osemenitev potrebnih za potrjeno brejost), doba med telitvama pa krajša (Johnsen in sod., 2016).

2.4 OCENA STOPNJE STRESA

Stres lahko vrednotimo z ugotavljanjem koncentracije glukokortikoidov, ki zaradi delovanja stresorjev v organizmu intenzivno nastajajo. Pri govedu je najpomembnejši glukokortikoid kortizol, v manjši meri pa se v nadledvični žlezi tvori tudi kortikosteron. Izločanje kortizola

regulira os HPA. Nastajanje kortizola regulira ACTH, ki se tvori v adenohipofizi. Na izločanje ACTH vpliva hormon CRH iz hipotalamusa (Brown, 1994).

Glukokortikoide proizvajajo celice cone fascikulate in cone retikularis skorje nadledvične žleze (Taves in sod., 2011). Pri novorojenih teletih v krvni plazmi prevladuje kortizol, kortikosteron se pojavi kasneje, med desetim in štirinajstim dnevom starosti (Venkataseshu in Estergreen, 1970).

Nespecifični indikatorji stresa so tudi nekateri krvni in biokemični parametri: povečana koncentracija β -endorfina, spremenjeno razmerje med nevtrofilci in limfociti v korist nevtrofilcev, višja koncentracija neesterificiranih maščobnih kislin (NEFA), β -hidroksimaslene kisline (BHBA), uree, večja aktivnost kreatinin kinaze (CK), laktat dehidrogenaze (LDH) in alkalne fosfataze (AP) ter nižja koncentracija glukoze. Če gre za akutni stres, se lahko kot posledica dehidracije pojavi povišana koncentracija skupnih proteinov in albuminov. V stanju kroničnega stresa pa se lahko povečajo vrednosti proteinov akutne faze (serumski amiloid A, haptoglobulin in ceruloplazmin) (Trevisi in Bertoni, 2009; Broom, 2003; Broom, 2006).

Koncentracijo kortizola in kortikosterona kot indikatorja stresa pri govedu, lahko določamo v krvi, slini, mleku, urinu, fecesu in dlaki. Za ugotavljanje ravni kortizola kot pokazatelja akutnega stresa navadno uporabljamo kri, slino, urin in feces. Vrednosti kortizola, izmerjene v teh bioloških materialih, prikazujejo odziv nadledvične žleze na stresni dejavnik za časovno obdobje od nekaj minut do maksimalno dva dni. Kortizol v dlaki pa je indikator kroničnega stresa (Heimbürge in sod., 2019). González-de-la-Vara in sod. (2011) navajajo, da je kortizol stabilen v dlaki več mesecev in celo let.

V krvi se kortizol nahaja v vezani in prosti obliki. Več kot 90% celotne količine kortizola v krvi je vezanega na beljakovine (globuline in albumine) (Gayrard in sod., 1996). Samo prosti kortizol je biološko aktivna oblika in deluje na ciljna tkiva (Mormede in sod., 2007).

Ugotavljanje koncentracije kortizola v slini predstavlja manj invaziven način kot merjenje v krvi. Kortizol preide iz krvi v celice slinskih žlez s pasivno difuzijo (Riad-Fahmy in sod., 1982). Zaradi takšnega načina prenosa, se v slini nahaja samo prosti kortizol. Vezani kortizol ne prehaja bariere med krvjo in slino (Fell in Shutt, 1986).

Glavno pot izločanja kortizola in njegovih metabolitov iz organizma predstavlja izločanje z urinom. Obstaja pozitivna korelacija med koncentracijo kortizola v urinu in koncentracijo prostega kortizola v krvni plazmi (Šamanc in Kirovski, 2008).

Pri kravah v laktaciji je možno koncentracijo kortizola ugotavljati tudi v mleku. Prosti kortizol prehaja iz krvi v mleko in je lahko pokazatelj akutnega stresa pri kravah (Bremel in Gangwer, 1978). Koncentracija kortizola v mleku je nižja kot v krvi in, kot ugotavljata Tucker in Schwalm (1977), predstavlja 4-10% koncentracije kortizola v krvni plazmi. Med 70 in 85 % kortizola se v mleku veže na kazein, laktoglobuline in laktoalbumine, preostali delež pa se nahaja v prosti obliki (Schwalm in Tucker, 1978).

V fecesu se nahajajo razgradnji produkti glukokortikoidov, ker se katabolizem večinoma odvija v jetrih. Metaboliti se z žolčem izločijo v črevo, kjer nadalje potekajo metabolni procesi pod vplivom črevesne mikroflore. Del metabolitov se po enterohepatični poti vrne v krvni obtok, del pa se izloči s fecesom (Palme in sod., 1999; Šamanc in Kirovski, 2008).

Ugotavljanje koncentracije kortizola v dlaki predstavlja neinvazivno in ustrezno metodo za ugotavljanje izpostavljenosti kroničnemu stresu. Koncentracija kortizola v dlaki nam prikaže intenzivnost tvorbe kortizola v času rasti dlake. Dlaka pri govedu zraste od 0,6 do 1 cm na mesec. V treh mesecih zaključi rast in se zamenja z novo (Comin in sod., 2011; Burnett in sod., 2014). Rast dlake poteka v ciklu, ki je sestavljen iz treh faz: anagen (faza rasti), katagen (prehodna faza) in telogen (faza mirovanja). Kortizol, pa tudi druge snovi, le v fazi anagena prehaja iz krvi v dlačni mešiček. Med vgraditvijo kortizola v dlako in pojavom tega dela dlake nad površino kože nastane časovni zamik, ki ga moramo upoštevati pri interpretaciji rezultatov (Heimbürge in sod., 2019). Glukokortikoidi primarno iz krvi z difuzijo prehajajo v dlako. Tako prehaja prosta oblika glukokortikoidov. Poleg difuzije iz krvi pa lahko glukokortikoidi v dlako prehajajo tudi iz lojnic in znojnic, ki so v neposredni bližini dlačne korenine. Produkti lojnic in znojnic lahko direktno prehajajo v dlačne mešičke ali pa se izločajo na površino kože in nadalje difundirajo v dlako (Harkey, 1993; Gow in sod., 2010). Možna je tudi lokalna proizvodnja glukokortikoidov v koži (Ito in sod., 2005). Kortizol pa lahko, kot navajajo Keckeis in sod. (2012) ter Slominski in sod. (2007), izhaja tudi iz drugih virov, kot je kontaminacija preko izločkov kot so urin, slina in znoj drugih živali v skupini.

Različni avtorji navajajo različne osnovne vrednosti kortizola v dlaki goveda. Pri 15 dni starih teličkah je bila vrednost kortizola $114,5 \pm 14,43$ pg/mg dlake. Pri 2 leti starih kravah je bila

vrednost nižja, in sicer $12,15 \pm 1,85$ pg/mg dlake (González-de-la-Vara in sod., 2011). Comin in sod. (2011) so pri kravah molznicah izmerili vrednost kortizola $2,5 \pm 0,10$ pg/mg dlake.

Vzorec dlake je najbolje vzeti s pomočjo električnega brivnika tik ob površini kože. Pomembno je, da odvzeti vzorec vsebuje dovolj aktivno rastoče dlake. To lahko dosežemo z metodo, kjer določeno področje kože obrijemo dvakrat v določenem časovnem razmiku ('shave-reshave method') (Keckeis in sod., 2012 ; Slominski in sod., 2007). V tem primeru nam drugi vzorec predstavlja dlako ene generacije. Kirschbaum in sod. (2009) opisujejo 'učinek izpiranja', saj so koncentracije kortizola višje v proksimalnih kot v distalnih segmentih dlake. Wester in sod. (2016) navajajo kot možno razlago vpliv UV sevanja na razgradnjo kortizola, Acker in sod. (2018) pa tudi vpliv pogostosti nege živali. Vzorci se do analize lahko nahajajo na sobni temperaturi, saj temperatura ne vpliva na razpadanje kortizola v dlaki (Russel in sod., 2012). Pomembno pa je, da so vzorci dlake shranjeni na temnem (Roth in sod., 2016; Wester in sod., 2016).

3 MATERIAL IN METODE DE LA

3.1 ŽIVALI V RAZISKAVI

3.1.1 Odrasli plemenski biki rjave pasme

V prvi del raziskave, pri kateri smo proučevali kvaliteto semena, je bilo vključenih 74 plemenskih bikov rjave pasme. Te živali so bile v letih od 1992 do 2010 vključene v program umetnega osemenjevanja in so bile nastanjene v Osemenjevalnem centru Preska (KGZS – Zavod Ljubljana). Glede na način reje na gospodarstvu, iz katerega so izhajale, smo jih razdelili v dve skupini. V prvi skupini je bilo 52 bikov, ki od prvega dne po rojstvu niso imeli stika z materami in so bili v zgodnjem življenjskem obdobju napajani z mlekom ali mlečnim nadomestkom. V drugi skupini je bilo 22 bikov, ki so kot teleta bili v stiku z materami, pri katerih so sesali do starosti dva meseca. Podatke o načinu reje smo pridobili na osnovi telefonsko opravljenega vprašalnika z lastniki bikovskih mater rjave pasme.

3.1.2 Teleta

V drugi del raziskave, pri kateri smo primerjali koncentracijo kortizola v dlaki med teleti, ki so bila takoj po rojstvu ločena od mater in tistimi, ki so bila v stiku z materami vsaj dva meseca po rojstvu in so pri njih sesala, je bilo vključenih 24 telet rjave pasme iz osmih rej. Razdelili smo jih v štiri skupine po šest živali, glede na spol in način reje. Šest teličk in šest bikcev je bilo v stiku z materami, pri katerih so sesali, šest teličk in šest bikcev pa je bilo takoj po rojstvu ločenih od mater.

V obeh delih raziskave nismo uporabljali invazivnih metod. Prvi del raziskave je bil izveden retrospektivno, s pomočjo podatkov, ki se redno zbirajo na testni postaji v vzrejališču za mlade plemenske bike v Novi Gorici in osemenjevalnem centru Preska. V drugem delu raziskave smo teletom, po predhodnem dovoljenju lastnikov telet, z brivnikom odvzeli manjšo količino dlake, nismo pa izvedli nobenega drugega postopka z živalmi, zato dovoljenje za uporabo živali v raziskavi ni bilo potrebno.

3.2 METODE

3.2.1 Določanje telesne mase, prirasta in obsega mod

Biki, vključeni v prvi del raziskave, so bili pri starosti štiri do pet mesecev z domačih gospodarstev premeščeni v Vzrejališče za mlade plemenske bika (KGZS – Zavod Nova Gorica) (vzrejališče). Za raziskavo smo uporabili podatke o njihovi telesni masi, ki je bila določena ob prihodu v vzrejališče in ob starosti eno leto. V raziskavi smo med skupinama bikov primerjali tudi podatke o povprečnem dnevnem prirastu in obsegu mod pri starosti eno leto. Pri starosti 12-14 mesecev so bile živali premeščene v osemenjevalno središče (Osemenjevalni center Preska; KGZS – Zavod Ljubljana).

3.2.2 Določanje parametrov semena

V raziskavi smo uporabili podatke o volumnu ejakulata, koncentraciji semenčic v ejakulatih in skupnem številu semenčic v ejakulatih. Volumen je bil določen z odčitavanjem količine ejakulata v graduirani zbirni epruveti. Koncentracija semenčic v mililitru ejakulata je bila ugotovljena s fotometrom (IMV Technologies, L'Aigle, France). Skupno število semenčic je bilo določeno kot zmnožek volumna ejakulata in koncentracije semenčic v mililitru ejakulata. Interval odvzema semena je bil štiri do sedem dni. Uporabili smo podatke 4.085 ejakulata bikov rjave pasme, ki so bili kot teleta ločeni od mater, in 1.210 ejakulata bikov, ki so bili po rojstvu vsaj dva meseca v stiku z materami in so pri njih sesali. Podatke o posameznih ejakulatih smo razvrstili glede na starost bikov ob odvzemu semena. Število bikov in ejakulata v posameznem starostnem obdobju prikazuje tabela 1. V raziskavo smo vključili le podatke o ejakulatih, odvzetih do starosti štirih let.

Tabela 1: Število bikov in analiziranih ejakulatov glede na starost in stik z materjo

Table 1: The number of bulls and ejaculates based on age and contact with the dam

Starost bikov, ki kot teleta niso bili v stiku z materami (leta)	Število bikov	Število analiziranih ejakulatov
1-2	52	684
2-3	52	2.599
3-4	52	802
Starost bikov, ki so bili kot teleta v stiku z materami (leta)		
1-2	22	467
2-3	22	649
3-4	22	94

3.2.3 Odvzem vzorcev dlake

Prvi vzorec dlake smo odvzeli pri teletih v starosti do 14 dni, drugega pa z istega mesta približno mesec dni kasneje. Vzorca (po 0,5 g) smo z električnim brivnikom odvzeli s korena repa. Do analize smo vzorce hranili v zamrzovalniku pri -20 °C. Vzorce dlake smo jemali od marca do oktobra v letu 2018.

Teličkam, ločenim od mater, smo prvi vzorec dlake odvzeli pri starosti od enega do 13, drugega pa pri starosti 28 do 40 dni.

Bikcem, ločenim od mater, smo prvi vzorec odvzeli pri starosti sedem do 14, drugega pa pri starosti 37 do 40 dni.

Teličkam, ki so bile v stiku z materami, smo prvi vzorec dlake odvzeli pri starosti dva do 14, drugega pa pri starosti 33 do 40 dni.

Pri enaki starosti smo prvi in drugi vzorec odvzeli tudi bikcem, ki so bila po rojstvu v stiku z materami.

3.2.4 Ekstrakcija kortizola iz dlake

Vzorci dlake smo dali v steklene čaše s prostornino 10 ml in dodali 3 ml izopropanola (Carlo Erba reagents, Rodano, Italija). Vzorec smo zmešali s stekleno paličico. Nato smo odlili izopropanol in postopek še enkrat ponovili. Vzorce smo nato dali v sušilnik (Chirana, Stará Turá, Čehoslovaška) ter jih tri ure sušili pri temperaturi 40 °C. Nato smo vsak posamičen vzorec dlake dali v terilnik, ga prelili s tekočim dušikom ter dlako s pestilom zdrobili. Zdrobljeni vzorec smo prestavili v stekleno čašo in ga eno uro sušili na 40 °C. S tehtnico AND electronic balance (A&D Company, Tokyo, Japan) smo odtehtali 50 mg zdrobljene dlake in jo dali v kriovialo. Odtehtanim vzorcem smo dodali po 500 µl 55 % metanola (LiChrosolv®, Darmstadt, Nemčija). Tako pripravljene vzorce smo 30 minut pri 500 obratih na minuto (rpm) stresali na stresalniku vibromix 313 EVT (Tehtnica, Železniki, Slovenija). Vsebinsko smo 20 minut pri 4 °C in 4000 rpm centrifugirali s centrifugo rotina 420R (Hettich, Tuttlingen, Nemčija). Po centrifugiranju smo ekstrakt odpipetirali v parcelacijske epruvete. Ekstrakte smo do analize hranili pri temperaturi -20 °C.

Koncentracijo kortizola v ekstraktih dlake smo določili z uporabo komercialnega testa ELISA (Demeditec, Kiel, Germany). Metoda določanja koncentracije kortizola v dlaki je bila predhodno validirana (Nedić in sod., 2018). Absorpcijo smo merili z mikrotiterskim fotometrom Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, ZDA) pri 450 nm. Koncentracijo kortizola smo izrazili v ng na g dlake.

3.3 STATISTIČNA ANALIZA

Statistično analizo smo izvedli s programsko opremo NCSS (Kaysville, Utah, ZDA). Podatke o parametrih semena bikov, ki so bili po rojstvu v stiku z materami, in tistih, ki so bili po rojstvu ločeni od mater, smo izvedli s testom analize variance ponavljajočih meritev. Pri tem smo starost in način reje (ločeni od mater ali skupaj z materami) uporabili kot neodvisni spremenljivki, podatke o parametrih semena pa kot odvisne spremenljivke. Statistično značilne razlike smo določili s *post-hoc* testom po Tukeyu in Kramerju.

Primerjavo telesne mase, prirasta in obsega mod med skupinama živali smo izvedli z enosmerno analizo variance (ANOVA), ki mu je sledil *post-hoc* test po Tukeyu in Kramerju.

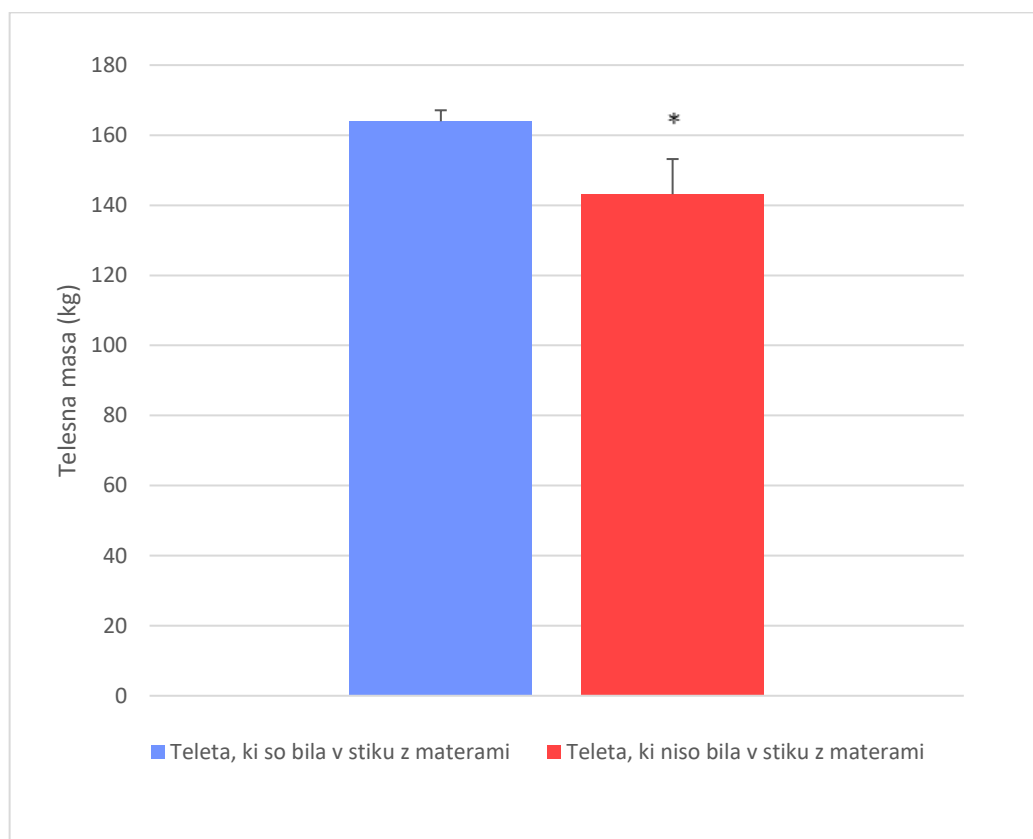
Morebitne razlike v koncentraciji kortizola v dlaki med posameznimi skupinami telet smo statistično ovrednotili z enosmerno analizo variance in *post-hoc* testom po Tukeyu in Kramerju.

Kot statistično značilno smo privzeli vrednost $p < 0,05$. Rezultati so prikazani kot povprečje \pm standardna napaka (SE).

4 REZULTATI

4.1 TELESNA MASA, POVPREČNI DNEVNI PRIRAST IN OBSEG MOD

Telesno maso telet ob prihodu v vzrejališče prikazuje slika 1.



Slika 1: Telesna masa telet ob prihodu v vzrejališče pri starosti štiri do pet mesecev

Figure 1: Body weight of the young bulls at the arrival to the breeding center at the age of 4 to 5 months

Legenda:

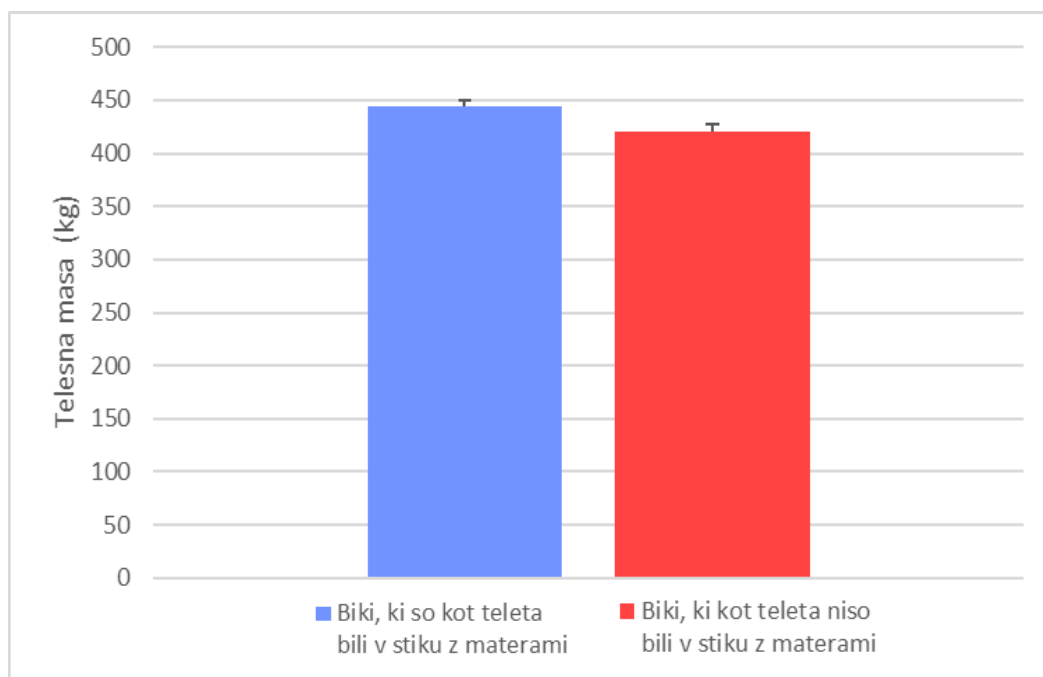
* – telesna masa telet, ki so bili ločeni od mater, je bila ob prihodu v vzrejališče (pri starosti štiri do pet mesecev) statistično značilno nižja ($p < 0,05$) kot pri teletih, ki so bila v stiku z materami

Legend:

* – body weight of young maternally separated bulls at the age of 4 to 5 months was significantly lower ($p < 0.05$) in comparison to maternally non-separated young bulls

Telesna masa telet, ki so bila ločena od mater, je bila ob prihodu v vzrejališče (pri starosti štiri do pet mesecev) statistično značilno nižja ($p < 0,05$) kot pri teletih, ki so bila v stiku z materami (slika 1).

Telesno maso bikov pri starosti eno leto prikazuje slika 2.

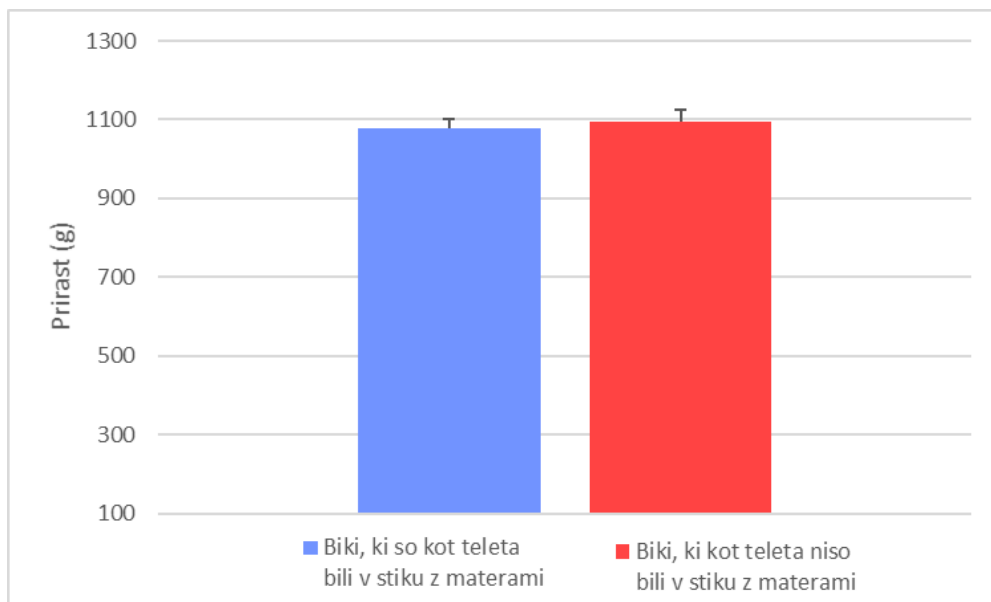


Slika 2: Telesna masa bikov pri starosti eno leto

Figure 2: Body weight of bulls at the age of one year

Kot je prikazano na sliki 2, se pri starosti eno leto telesna masa bikov, ki so bili kot teleta v stiku z materami, in tistih, ki so bili ločeni od mater, ni statistično značilno razlikovala ($p = 0,0508$).

Povprečni dnevni prirast bikov rjave pasme v času testa na Testni postaji v Novi Gorici prikazuje slika 3.

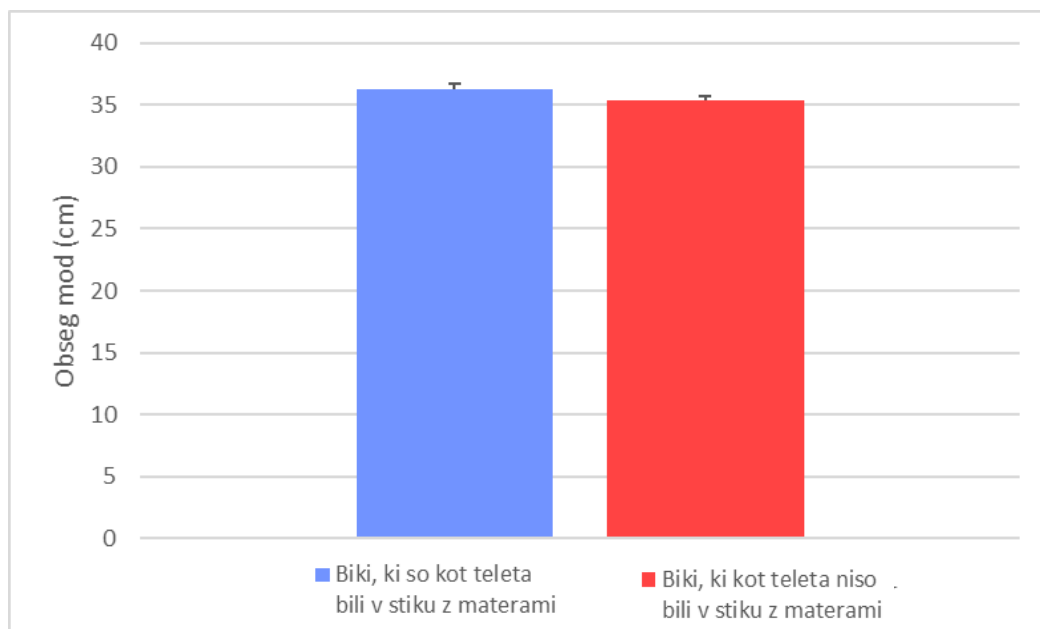


Slika 3: Povprečni dnevni prirast (g)

Figure 3: Mean daily weight gain (g)

Med povprečnim dnevним prirastom bikov, ki so kot teleta bili v stiku z materami, in tistimi, ki z materami niso bili v stiku, nismo ugotovili statistično značilnih razlik (slika 3).

Obseg mod plemenskih bikov rjave pasme pri starosti eno leto prikazuje slika 4.



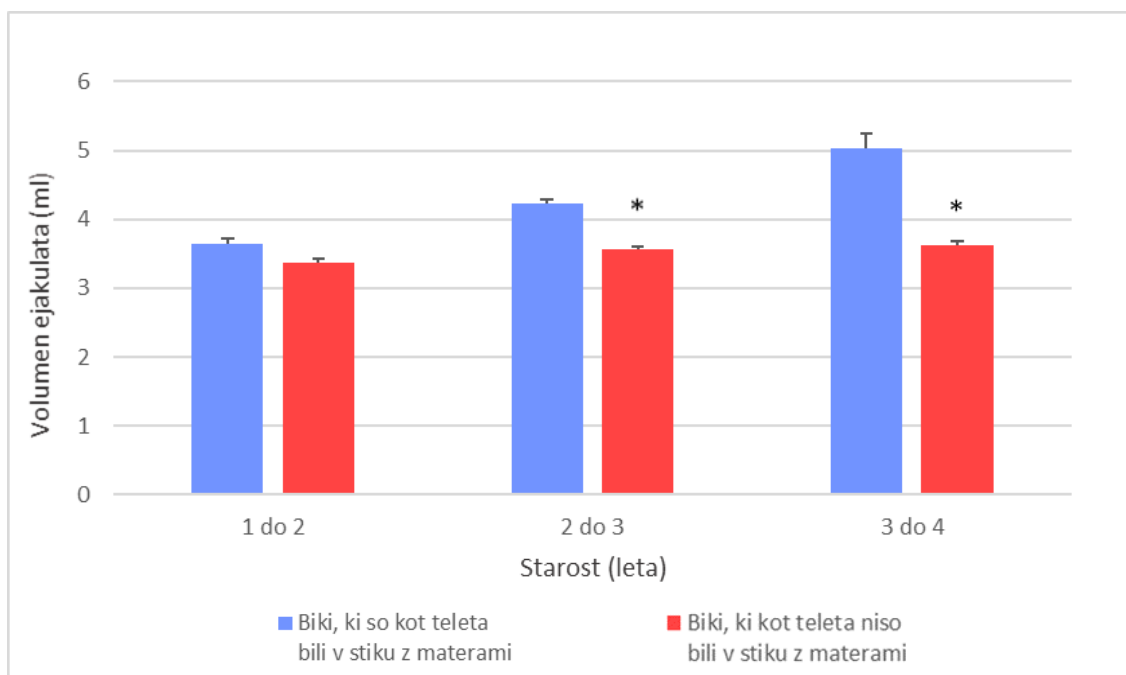
Slika 4: Obseg mod pri starosti eno leto

Figure 4: Testes circumference at the age of one year

Pri obsegu mod bikov, ki so bili kot teleta v stiku z materami, in bikov, ki z materami niso bili v stiku, ni bilo ugotovljenih statistično značilnih razlik (slika 4).

4.2 PARAMETRI KVALITETE SEMENA

Na sliki 5 je prikazan volumen ejakulatov glede na način reje in starost plemenskih bikov rjave pasme.



Slika 5: Volumen ejakulata (ml)

Figure 5: Ejaculate volume (mL)

Legenda:

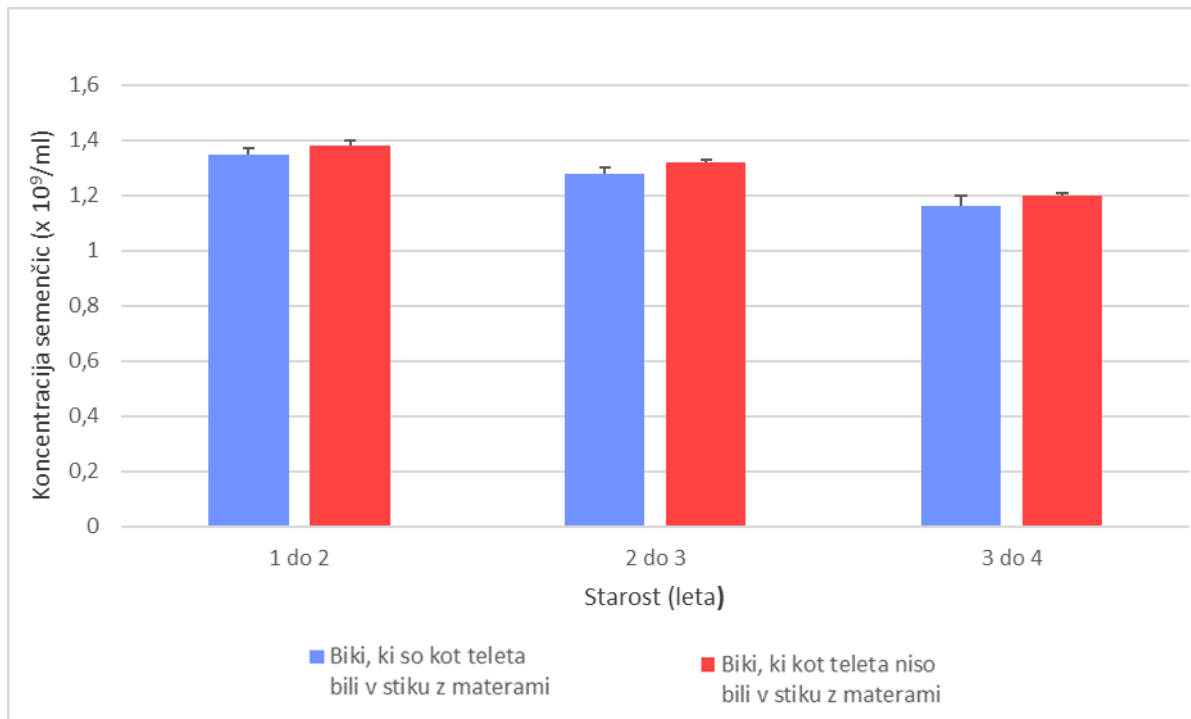
* – volumen ejakulatov bikov pri starosti dveh do treh in treh do štirih let, ki kot teleta niso bili v stiku z materami, je bil statistično značilno nižji ($p < 0,05$) od volumna ejakulatov bikov, ki so kot teleta bili v stiku z materami

Legend:

* – ejaculate volume of two to three and three to four years old maternally non-separated bulls was significantly lower ($p < 0.05$) in comparison to maternally non-separated young bulls

Statistična analiza je pokazala, da je pri starosti dveh do treh in treh do štirih let volumen ejakulatov bikov, ki so bili kot teleta ločeni od mater, statistično značilno manjši kot pri bikih, ki so bili kot teleta v stiku z materami. Pri starosti enega do dveh let nismo ugotovili statistično značilnih razlik med obema skupinama plemenskih bikov rjave pasme.

Koncentracijo semenčic v ejakulatu prikazuje slika 6.

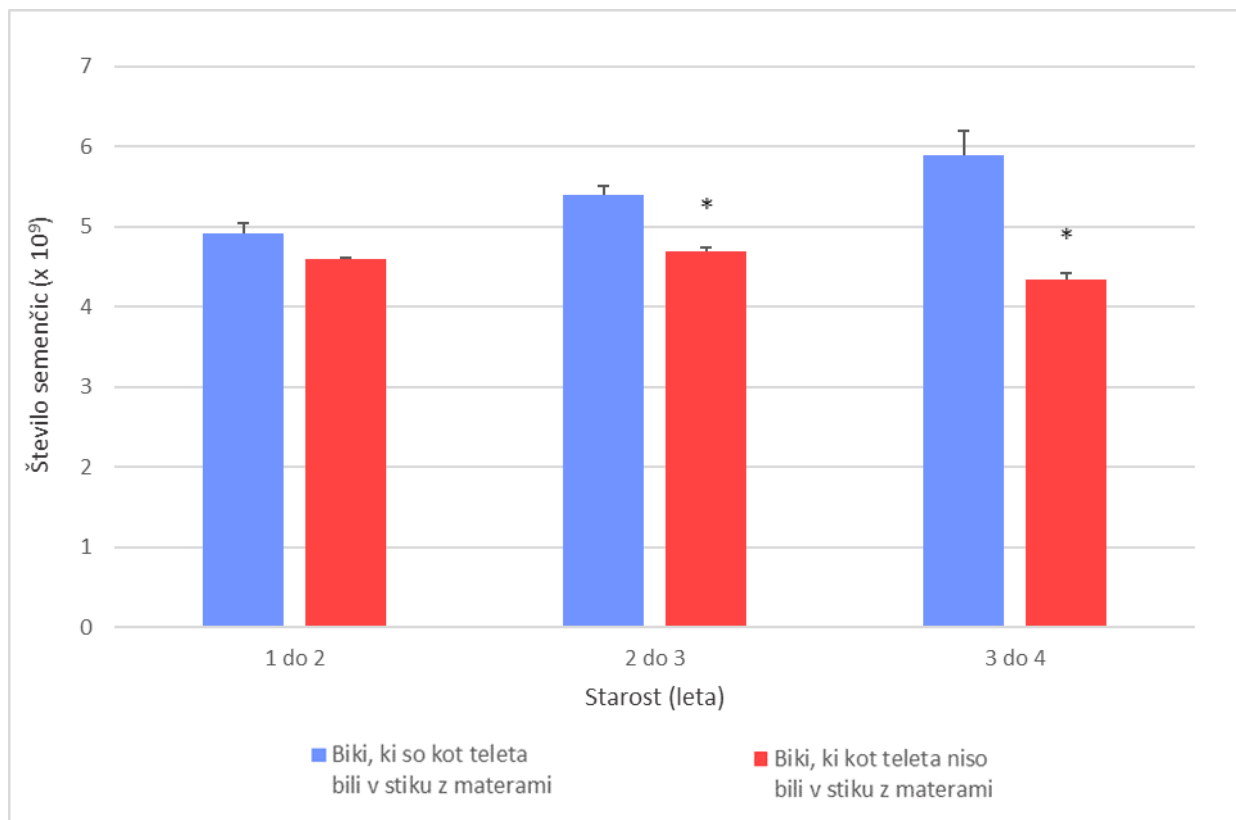


Slika 6: Koncentracija semenčic (x 10⁹/ml)

Figure 6: Sperm concentration (x 10⁹/mL)

Koncentracija semenčic v ejakulatu bikov, ki so kot teleta bili v stiku z materami, in bikov, ki z materami po rojstvu niso bili v stiku, se statistično ni razlikovala (slika 6).

Število semenčic v ejakulatu prikazuje slika 7.



Slika 7: Število semenčic v ejakulatu (x 10⁹)

Figure 7: Total sperm output (x 10⁹)

Legenda:

* – število semenčic v ejakulatu bikov pri starosti dve do tri in tri do štiri leta, ki kot teleta niso bili v stiku z materami, je bilo statistično značilno nižje ($p < 0,05$) od števila semenčic v ejakulatu bikov, ki so kot teleta bili v stiku z materami

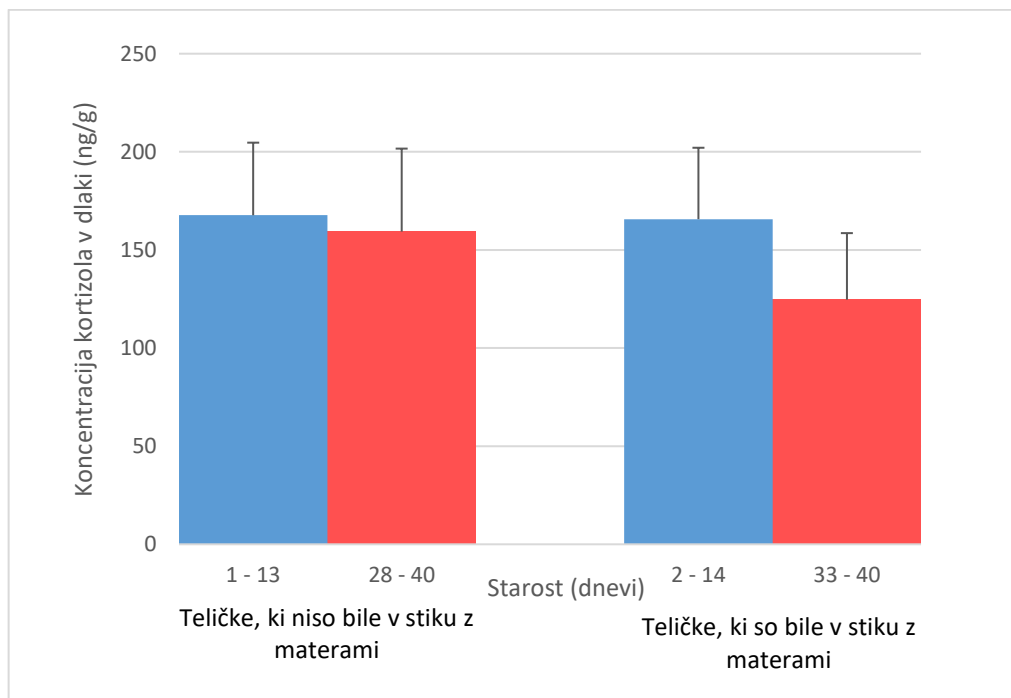
Legend:

* – total sperm output of two to three and three to four years old maternally non-separated bulls was significantly lower ($p < 0.05$) in comparison to maternally non-separated young bulls

Število semenčic v ejakulatu je bilo pri bikih, ki so kot teleta bili ločeni od mater, manjše kot pri bikih, ki so bili v stiku z materami (slika 7). Statistično značilne razlike smo ugotovili pri bikih v starosti dveh do treh let in treh do štirih let, ne pa pri starosti enega do dveh let.

4.3 OCENA STRESA Z UGOTAVLJANJEM KONCENTRACIJE KORTIZOLA V DLAKI

Koncentracija kortizola v dlaki teličk je prikazana na sliki 8.

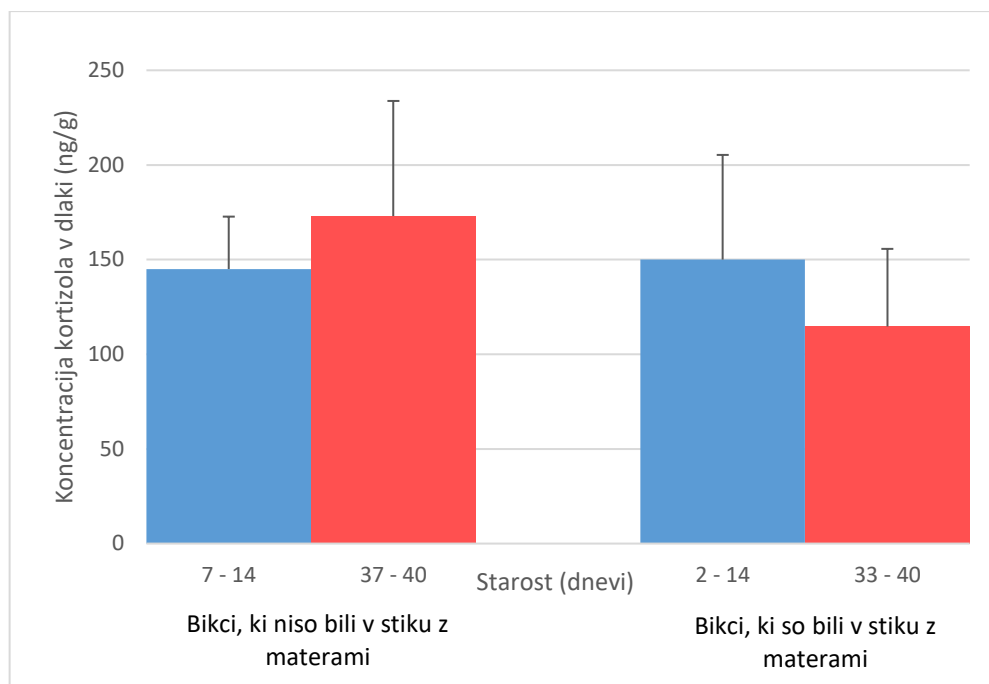


Slika 8: Koncentracija kortizola v dlaki teličk (ng/g)

Figure 8: Hair cortisol concentration in heifers (ng/g)

Kot je razvidno s slike 8, se koncentracija kortizola v dlaki pri teličkah, ki so bile v stiku z materami, statistično ni razlikovala od koncentracije kortizola v dlaki teličk, ki so bile od prvega dneva po rojstvu ločene od mater.

Koncentracija kortizola v dlaki bikcev je prikazana na sliki 9.



Slika 9: Koncentracija kortizola v dlaki bikcev (ng/g)

Figure 9: Hair cortisol concentration in male calves (ng/g)

Kot je razvidno s slike 9, se koncentracija kortizola v dlaki bikcev, ki so bili v stiku z materami, statistično ni razlikovala od koncentracije kortizola v dlaki bikcev, ki niso bili v stiku z materami.

5 RAZPRAVA

V številnih študijah je bilo ugotovljeno, da zgodnji stik matere in mladiča pomembno vpliva na razvoj osrednjega živčevja in sposobnost adaptacije na stres ter vedenje v obdobju odraslosti (Gould in sod., 1997; Daniels in sod., 2004; Takase in sod., 2012; McEwan, 2018). Opisani so tudi primeri vpliva zgodnje ločitve mladiča od matere na os HPA (Weaver, 2007). Večina študij o vplivu zgodnjega postnatalnega stresa na aktivnost osi HPA je bila izvedenih na modelu laboratorijskih živali. Podatkov o vplivu zgodnjega postnatalnega stresa na reprodukcijske funkcije goveda v literaturi skoraj ni. V naši raziskavi smo ugotavljali vpliv zgodnje ločitve telet od matere na rast živali, kvaliteto semena in vrednosti kortizola v dlaki. Kolikor nam je znano, je to prva študija, ki je proučevala razlike v kvaliteti semena, rasti živali in vrednostih kortizola v dlaki med teleti, ki so bila v stiku, in tistimi, ki so bila ločena od mater.

5.1 TELESNA MASA

Kot je razvidno iz slike 1, so imeli mladi biki, ki so bili v stiku z materami in pri njih sesali, ob prihodu v vzrejališče (pri starosti štiri do pet mesecev) statistično značilno večjo telesno maso od tistih, ki so bili ločeni od mater in napajani z mlekom oziroma mlečnim nadomestkom. Tako mleko kot mlečni nadomestek sta ustrezen vir beljakovin, kalcija in vitaminov, ki so pomembni za rast in razvoj teleta, zato predvidevamo, da razlika v telesni masi ni rezultat manjšega vnosa hranilnih snovi. Podobno tudi Roth in sod. (2009) v svoji raziskavi poročajo o manjšem prirastu telet, ki so bila hranjena z mlečnim nadomestkom v primerjavi s teleti, ki so sesala. To razliko pojasnjujejo z manjšo konzumacijo mlečnega nadomestka pri teletih, ki so bila ločena od mater. Avtorji niso razpolagali s podatki o količini mleka, ki so ga teleta posesala, zato njihova razlaga o manjšem prirastu temelji zgolj na predvidevanju. Teleta v naši raziskavi, ki so bila v stiku z materami, so lahko sesala ves čas, prav tako so teleta, ki so bila ločena od mater, imela neomejen dostop do mlečnega nadomestka. Kljub temu, da nimamo podatka o konzumaciji mleka oziroma mlečnega nadomestka, predvidevamo, da naj bi hranjenje *ad libitum* teleta zadostno oskrbelo s hranilnimi snovmi in omogočilo ustrezno rast in razvoj. Razlike v prirastu med skupinama so lahko posledica drugih vzrokov. Kot ugotavljajo Roth in sod. (2009) ločitev od mater za teleta predstavlja stres, ki zaradi učinka visoke koncentracije kortizola v krvi, povzroči

manjšo ješčnost. Prav tako se pri teh teletih pogosteje pojavljajo gastrointestinalna obolenja. Kortizol ima tudi neposredne vplive na aktivnost metabolizma. Zaradi stresa povišane vrednosti kortizola povečajo metabolizem ogljikovih hidratov, maščob in beljakovin, saj pospešijo glukoneogenezo in lipolizo (Ferguson in sod., 2009). Omenjeni katabolni učinki kortizola se lahko pokažejo kot slabši prirast.

Pri starosti eno leto so bili biki, ki so bili kot teleta v stiku z materami, težji od tistih, ki so bili kot teleta ločeni od mater. Statistična analiza sicer ni pokazala značilnih razlik, vendar so bili rezultati zelo blizu statistične značilnosti ($p = 0,0508$). V vzrejališču je oskrba obeh skupin potekala na enak način. Nameščeni so bili v enakih prostorih in krmljeni z enako krmo, tako da na razliko v telesni masi niso vplivali pogoji reje. Sicer zaradi nedokazane statistično značilne razlike ne moremo zaključiti, da je način reje v prvih tednih življenja in s tem povezan stres vplival na telesno maso v kasnejšem obdobju življenja. Vendar rezultati naše raziskave nakazujejo pozitiven vpliv reje teleta skupaj z materjo. Ker gre za razmeroma majhne razlike, bi bilo za potrditev te domneve potrebno v statistično analizo vključiti večje število živali. Tudi Lidfors (1996) ter Flower in Weary (1999) so ugotovili pozitiven vpliv reje teleta skupaj z materjo. Teleta, ki po telitvi ostanejo s kravami, se hitreje postavijo na noge in hitreje priraščajo. Kuhn in Schanberg (1998) sta v svoji raziskavi na podganah ugotavljala vpliv zgodnje ločitve mladiča od matere. Ločitev zmanjša sintezo encima ornitin dekarboksilaze, ki omogoča normalno rast in razvoj celic. Prav tako se zmanjša celični odziv na rastni hormon, prolaktin in inzulin. Vsi navedeni odzivi so posledica pomanjkanja materinega negovanja. Študija dokazuje, da sta zgodnji stik mladiča z materjo in materina skrb zelo pomembna dejavnika, ki omogočita ustrezen razvoj vedenja in rast mladiča. Wagner in sod. (2015) ugotavljajo, da imajo krave, ki so bile kot teleta ločene od mater, višje bazalne vrednosti kortizola v primerjavi s tistimi, ki so bile v stiku z materami in so kot teleta sesale. V literaturi ni podatkov o bazalnih vrednostih kortizola pri bikih, ki so bili ločeni od mater, in tistih, ki so bili z njimi v stiku. V naši raziskavi nismo mogli izmeriti kortizola pri bikih, saj gre za retrospektivno študijo in biki niso več na voljo za jemanje krvi. Vendar če je, podobno kot pri kravah (Wagner in sod., 2015), bazalna vrednost kortizola višja pri bikih, ki so bili ločeni od mater, bi to lahko povečalo katabolne procese tudi v odrasli dobi.

5.2 VPLIV ZGODNJE LOČITVE BIKCEV OD MATERE NA PARAMETRE SEMENA

Vplivi zgodnje ločitve od matere na os HPG in na reprodukcijske sposobnosti v odrasli dobi še vedno niso povsem pojasnjeni. Pri samcih podgan pre- in postnatalni stres povzroči spremembe v obnašanju in zniža raven testosterona v krvi (Rhees in sod., 2001; Bodensteiner in sod., 2014; Ogrizek in sod., 2018). Kontakt med materjo in teletom v prvih tednih življenja ima številne pozitivne vplive tudi v odrasli dobi (Johnsen in sod., 2016). V literaturi pa nismo našli podatkov o vplivih tehnologije reje telet na parametre semena pri bikih.

V naši retrospektivni študiji smo primerjali parametre semena med biki, ki so bili kot teleta ločeni od mater, in tistimi, ki so bili z njimi v stiku. Volumen ejakulata in število semenčic v ejakulatu sta se med skupinama statistično razlikovala, pri koncentraciji semenčic v ejakulatu pa nismo ugotovili statistično značilnih razlik. Omenjene razlike smo ugotovili pri starosti dveh do treh ter treh do štirih let, ne pa med eno do dve leti starimi biki. Bikom iz obeh skupin je bilo seme odvzeto na enak način, tako da to ni moglo vplivati na razliko med njimi. Številne študije opisujejo vpliv stresa na delovanje moških spolnih organov. V času stresa je vrednost glukokortikoidov povišana, kar zavira in moti endokrino signaliziranje moške reproduktivne osi, saj je izločanje LH zavrto. To se odraža v involuciji testisov in zmanjšanem izločanju testosterona. Posledično se zmanjša libido in plodnost (Geraghty in Kaufer, 2015; Hardy in sod., 2005). Bodensteiner in sod. (2014) poročajo o zakasneli puberteti in nižjih vrednostih testosterona pri podganah, ki so bile ločene od mater. Liu in sod. (1997) so v svoji študiji na podganah ugotovili, da zgodnja ločitev od matere vpliva na razvoj mod. Moda so bila pri podganah, ločenih od mater, za 8 % lažja kot pri podganah, ki so imele stik z materami. V nasprotju z njimi pa v naši študiji nismo ugotovili statistično značilnih razlik v obsegu mod med biki, ki so bili v stiku z materami, in tistimi, ki z materami niso imeli stika (slika 4). Meritve obsega mod so bile opravljene pri živih bikih ročno z merilnim trakom in niso nujno povsem točne, tako da ti rezultati niso povsem zanesljivi. Čeprav nismo ugotovili razlik v obsegu mod, naši rezultati kažejo, da ima zgodnja ločitev telet od mater vpliv na razvoj gonad in tvorbo semena. Ugotovili smo manjši volumen ejakulata ter nižje skupno število semenčic pri odraslih bikih, ki so bili po rojstvu ločeni od mater. Kakšen je mehanizem vpliva tovrstnega stresa zaenkrat ni znano. Ker stresni hormoni vplivajo zaviralno na delovanje spolnega sistema, bi lahko stres že v zgodnjem obdobju vplival na rast mod, saj se v obdobju po rojstvu sertolijeve celice intenzivno delijo, od pubertete naprej pa je njihovo število stalno. Število sertolijevih

celic pa določa število semenčic pri odraslih živalih. Stres bi tako lahko morebiti zmanjšal intenzivnost delitev sertolijevih celic, vendar pa je to le domneva. Druga možnost je dolgotrajni vpliv na delovanje endokrinega sistema. V raziskavi na miših je bilo ugotovljeno, da stres pred rojstvom povzroča nižjo raven testosterona pri odraslih mišjih samcih in zmanjšano produkcijo semenčic (Ogrizek in sod., neobjavljeno). Podobno bi lahko nižja raven testosterona pri bikih vplivala na manjše število semenčic, vendar tega nismo mogli ugotovljati. Ker je bila naša raziskava retrospektivna, nismo imeli vzorcev krvi za ugotavljanje vrednosti spolnih hormonov. Da bi videli ali zgodnji postnatalni stres trajno vpliva na tvorbo spolnih hormonov, bi bilo potrebno v prihodnjih študijah pridobiti vzorce krvi bikov, ki izvirajo iz različnih načinov reje, in neposredno določiti aktivnost osi HPA in HPG. Wagner in sod. (2015) so poročali o višji ravni bazalnega kortizola pri kravah, ki so bile ločene od mater takoj po rojstvu. Podobnih podatkov za bike nismo našli. Vendar če je odziv na ločitev od matere pri bikih enak kot pri telicah, bi lahko visoke vrednosti kortizola v krvi pri odraslih bikih vplivale zaviralno na tvorbo testosterona v modih, posledično pa bi lahko nižja raven testosterona vplivala na zmanjšano produkcijo semenčic pri odraslih bikih. Zanimivo bi bilo pridobiti tudi vzorce mod mladih bikov iz različnih načinov reje in ugotoviti ali obstaja razlika v proliferacijski aktivnosti sertolijevih celic glede na stres telet.

Zanimiva je ugotovitev, da se razlike v parametrih semena pojavljajo le med skupinama bikov, starih dve do tri ter tri do štiri leta, ne pa med biki, stari eno do dve leti. Pri bikih puberteta nastopi pri starosti okrog deset mesecev. Takrat lahko proizvedejo prve ejakulate, vendar njihova sposobnost proizvodnje semena narašča še dlje časa. Obseg mod se povečuje do starosti približno 30 mesecev (Noakes, 1997), produkcija semena pa narašča do starosti pet let (Snoj in sod., 2013). Naša raziskava kaže, da volumen ejakulata in število semenčic v ejakulatu v opazovanem obdobju naraščata (do starosti štiri leta). Vendar je porast teh parametrov pri bikih, ki so bili kot teleta v stiku z materami, bolj intenziven (slika 5). Na podlagi teh rezultatov sklepamo, da se razvoj mod in spolnega aparata zaključí prej pri bikih, ki so bili ločeni od mater, in za katere predpostavljamo, da so bili zaradi ločitve od mater izpostavljeni stresu. Vzrok za to bi bile lahko povečane vrednosti bazalnega kortizola pri bikih, ki so bili ločeni od mater, saj je znano, da kortizol zavira tvorbo testosterona in s tem delovanje spolnega aparata (Retana-Marquez in sod., 2003). Ugotovljeno je bilo, da pri ljudeh kronični stres povzroči zgodnejšo puberteto in posledično zgodnejšo spolno zrelost (Vänskä in sod., 2011; Del Giudice, 2014). Na podlagi te ugotovitve predvidevamo, da bi lahko stres zaradi zgodnje ločitve telet od mater

vplival na zgodnejši nastop spolne zrelosti bikov in prej zaključen razvoj spolnega aparata, zaradi česar bi se pojavile razlike v skupnem številu semenčic po starosti dveh let. Menimo, da je to možna razlaga, zakaj razlike v parametrih semena nastopijo pri starosti dveh do treh let in ne pri starosti enega do dveh let, seveda pa bi bilo za dokončno potrditev te razlage potrebno opraviti dodatne raziskave.

Rezultati naše raziskave so odprli vprašanje o vplivu zgodnjega postnatalnega stresa na kasnejšo reprodukcijsko sposobnost. V raziskavi smo uporabili podatke o parametrih kvalitete semena bikov, vendar zgodnji postnatalni stres najverjetneje vpliva na delovanje osi HPG tudi pri drugih živalskih vrstah in človeku. Poleg zgodnje ločitve od matere, bi lahko tudi drugi stresni dejavniki (neprimerni življenjski pogoji, nezadostna skrb in bolezni) trajno vplivali na delovanje osi HPA in tudi osi HPG. Veliko študij opisuje vplive postnatalnega stresa na obnašanje in mentalno zdravje ljudi (Vänskä in sod., 2011; Del Giudice, 2014), povezava med postnatalnim stresom in reprodukcijskimi parametri (kvaliteto semena) pa še ni bila opisana. Rezultati torej kažejo na vpliv neonatalnega okolja na razvoj in delovanje reproduktivnih organov.

Vsekakor so rezultati te raziskave pomembni tudi za proizvodnjo semena pri plemenskih bikih namenjenih za osemenjevanje goveda. Zmanjšano število semenčic v ejakulatu bikov, ki so bili kot teleta ločeni od mater, ni tolikšno, da bi pri naravnem pripustu vplivalo na uspešnost oploditve. Manjše število semenčic v ejakulatu pa lahko pomembno vpliva na število pripravljenih doz semena za umetno osemenjevanje. Število proizvedenih doz za osemenjevanje je še dodatno manjše, če upoštevamo število odvzetih ejakulatov v obdobju enega leta. Ta razlika ima lahko pomemben ekonomski pomen za osemenjevalna središča, saj je število semenčic v ejakulatih bikov, ki so bili kot teleta v stiku z materami, več kot 10 % večje, kot pri bikih, ki so bili ločeni od mater.

5.3 OCENA STRESA Z UGOTAVLJANJEM KONCENTRACIJE KORTIZOLA V DLAKI

Z ugotavljanjem koncentracije kortizola v dlaki smo želeli ovrednotiti stopnjo stresa, ki jo predstavlja zgodnja ločitev telet od mater. Tako smo koncentracijo kortizola v dlaki telet obeh spolov, ki so bila v stiku z materami, in tistih, ki so bila takoj po rojstvu ločena od mater,

primerjali takoj po rojstvu in pri starosti okrog 40 dni. Kot smo predvidevali, so imela teleta, ki so bila po rojstvu takoj odstavljena in napajana z mlečnim nadomestkom, v dlaki višjo raven kortizola kot teleta, ki so bila po rojstvu v stiku z materami. Takšen trend smo opazili tako pri telicah kot pri bikcih (sliki 8 in 9), vendar pa razlike niso bile statistično značilne. Izpostavljenost stresu poveča aktivnost osi HPA, zato lahko koncentracijo kortizola uporabljamo kot indikator stresa. Nevroni paraventricularnega jedra hipotalamusa tvorijo CRH, ki sproži sproščanje ACTH iz adenohipofize v kri. V skorji nadledvične žleze ACTH spodbuja nastajanje in sproščanje kortizola. V fazi anagena, torej v fazi, ko dlaka raste, kortizol iz krvi s pasivno difuzijo prehaja v rastočo dlako. Z določanjem koncentracije kortizola v dlaki ugotavljamo retrospektivno aktivnost osi HPA v daljšem časovnem obdobju, torej izpostavitve kroničnemu stresu (Heimbürge in sod., 2019). Vzorci dlake so bili pri vseh teletih odvzeti na enak način, v približno enakem časovnem razmiku in na istem mestu. Kot navajajo Heimbürge in sod. (2019), je kortizol v dlaki stabilen več mesecev in celo let, zato menimo, da na rezultat ni vplival različen čas skladiščenja vzorcev. Pred ekstrakcijo smo dlako oprali z izopropanolom in tako odstranili kortizol s površine dlake, kamor bi ga s slino lahko nanese krava ali druge živali iz črede (Nedić in sod., 2018). Teleta, ki so bila vključena v našo raziskavo, so izvirala iz različnih gospodarstev, zato nismo uspeli zagotoviti povsem enakih pogojev reje teh telet. Poleg proučevane spremenljivke so bile živali izpostavljene tudi drugim stresnim dejavnikom, kot so na primer: vročina, saj so bili vzorci odvzeti tudi v poletnih mesecih, različen odnos človeka do telet, različna higiena hlevov, različna ventilacija, osvetlitev, kontakt z drugimi teleti... Nekatera teleta so sesala le dvakrat dnevno, preostali čas pa so bila ločena od mater, nekatera pa so bila v stalnem stiku z materjo. Zaradi različnih pogojev reje ne moremo izključiti vpliva številnih drugih dejavnikov na počutje in stres pri teletih, kar bi se lahko odražalo z različno koncentracijo kortizola v dlaki. Predvidevamo, da raznoliki pogoji nastanitve in reje živali lahko zabrišejo neposreden vpliv ločitve telet od mater na intenzivnost tvorbe kortizola. V prihodnjih raziskavah nameravamo med seboj primerjati dve skupini telet z enega gospodarstva, kjer bi ena skupina živali bila v stiku z materami, druga skupina pa z njimi ne bi imela stika. Tako bi bile razmere znotraj reje bolj izenačene, to pa bi omogočilo podrobno vrednotenje ločitve teleta od matere kot stresnega dejavnika.

6 SKLEPI

1. Plemenski biki rjave pasme, ki so kot teleta bili v stiku z materami, so imeli ob prihodu v vzrejališče (pri starosti približno štiri mesece) statistično značilno večjo telesno maso kot njihovi vrstniki, ki niso bili v stiku z materami.
2. Pri starosti eno leto je bila telesna masa plemenskih bikov rjave pasme, ki so kot teleta bili v stiku z materami, večja kot pri bikih, ki niso bili v stiku z materami, vendar med skupinama ni bilo statistično značilnih razlik. Rezultati pa so zelo blizu statistične značilnosti ($p = 0,0508$). Z nadaljnjimi raziskavami na večjem številu živali v enakih pogojih reje bi lahko ugotovili vpliv zgodnjega postnatalnega stresa na prirast.
3. Plemenski biki rjave pasme, ki so kot teleta bili v stiku z materami, imajo statistično značilno večji volumen ejakulata in število semenčic v ejakulatu kot njihovi vrstniki, ki v zgodnjem postnatalnem obdobju niso bili v stiku z materami.
4. Koncentracija kortizola v dlaki telet, ki so bila v zgodnjem postnatalnem obdobju v stiku z materami, in njihovimi vrstniki, ki z njimi niso bili v stiku, se kljub višjim vrednostim pri teletih, ki niso imela stika z materami, statistično ni razlikovala. Potrebno bi bilo opraviti dodatne raziskave v standardiziranih pogojih reje.
5. V prihodnjih raziskavah bi bilo potrebno neposredno primerjati intenzivnost delovanja osi HPA in HPG pri plemenskih bikih, ki izhajajo iz rej, kjer so bili kot teleta ločeni od mater, in njihovimi vrstniki, ki so kot teleta z materami bili v stiku. Primerjava bazalnih vrednosti CRH, GnRH, ACTH, LH, FSH, kortizola in testosterona med skupinama bi omogočila ovrednotiti vpliv zgodnjega postnatalnega stresa na delovanje osi HPA in HPG.

7 ZAHVALA

V prvi vrsti gre največja zahvala mentorju izr. prof. dr. Tomažu Snoju in somentorju prof. dr. Gregorju Majdiču. Zahvaljujema se jima za vso pomoč pri zbiranju in obdelavi podatkov, motiviranju, podpori, potrpežljivosti, prijaznosti, stalni dostopnosti in strokovni podpori.

Zahvala velja tudi Katarini Babnik in Boštjanu Drolcu za prijaznost, potrpežljivost in tehnično pomoč pri delu.

Zahvaljujema se tudi Osemenjevalnemu centru Preska za vse potrebne podatke.

Zahvaljujema se tudi Egonu Štruklju iz KGZS – Nova Gorica za potrebne podatke.

Prav tako se zahvaljujema vsem rejcem telet, ki so nama z veseljem omogočili zbiranje vzorcev dlake. To so: Branko Strgar, Sebastjan Muznik, Jože Debeljak, Fanika Simeonov, Anton Kukenberger, Marjan Vrhovec, Janez Šali in Andrej Duša.

Za pregled naloge se zahvaljujema mag. Brigiti Grecc- Smole, dr. vet. med.

Raziskovalno delo je bilo finančno podprto preko programske skupine P4-0053.

Kaja: Zahvalila bi se svoji družini za vso pomoč in podporo, predvsem pri zbiranju vzorcev. Posebna zahvala pa gre Tadeju, ki mi je nudil oporo in me pomiril v stresnih trenutkih.

Nika: Zahvalila bi se mami za vso podporo in pomoč pri odvzemu vzorcev.

8 LITERATURA

Acker M, Mastromonaco G, Schulte-Hostedde AI. The effects of body region, season and external arsenic application on hair cortisol concentration. *Conserv Physiol* 2018; 6(1): 1–9.

Barbazanges A, Vallee M, Mayo W, et al. Early and later adoptions have different long-term effects on male rat offspring. *J Neurosci* 1996; 16: 7783–90.

Bodensteiner KJ, Christianson N, Siltumens A, Krzykowski J. Effects of early maternal separation on subsequent reproductive and behavioral outcomes in male rats. *J General Psychol* 2014; 14: 228–46.

Bremel RD, Gangwer MI. Effect of adrenocorticotropin injection and stress on milk cortisol content. *J Dairy Sci* 1978; 61(8): 1103–8.

Stres. In: Brglez I, Tavzes C, Tavzes R, eds. *Veterinarski terminološki slovar*. Ljubljana: Založba ZRC, 2013: 597.

Broom DM. Behaviour and welfare in relation to pathology. *Anim Behav Sci* 2006; 97(1): 73–83.

Broom DM. Transport stress in cattle and sheep with details of physiological, ethological and other indicators. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 2003; 110(3): 83–9.

Brown RE. *An introduction to neuroendocrinology*. Cambridge: University Press, 1994: 1–14.

Burnett TA, Madureira AM, Silper BF, et al. Factors affecting hair cortisol concentrations in lactating dairy cows, *J Dairy Sci* 2014; 97(12): 7685–90.

Comin A, Prandi A, Peric T, Corazzin M. Hair cortisol levels in dairy cows from winter housing to summer highland grazing, *Livest Sci* 2011; 138(1): 69–73.

Daniels WMU, Pietersen CY, Carstens ME, Stein DJ. Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in Response to a subsequent stressor. *Metab Brain Dis* 2004; 19: 3–14.

Del Giudice M. Early stress and human behavioral development: emerging evolutionary perspectives. *J Dev Orig Helth Dis* 2014; 5: 270–80.

Dobson H, Smith RF. What is stress, and how does it affect reproduction?. *Anim Reprod Sci* 2000; 60/61: 743–52.

Enriquez D, Hötzel MJ, Ungerfeld R. Minimising the stress of weaning of beef calves: a review. *Acta Vet Scand* 2011; 53(1): e 28 (8 str.)

<https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-28> (20.2.2019)

Fell LR, Shutt DA. Adrenocortical response of calves to transport stress as measured by salivary cortisol, *Can J Anim Sci* 1986; 66(3): 637–41.

Fenster L, Katz DF, Wyrobek AJ, et al. Effects of psychological stress on human semen quality. *J Androl* 1997; 18(2): 194–202.

Ferguson DC, Dinkolu L, Hoenig M. Glucocorticoides, mineralocorticoides and adrenolytic drugs. In: Riviere JE, Papich MG, eds. *Veterinary pharmacology and therapeutics*. 9th ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2009: 771–2.

Flower FC, Weary DM. The effects of early separation on the dairy function. *Wien Tierarztl Monatsschr* 1999; 86: 237–41.

Gayrard V, Alvinerie M, Toutain PL. Interspecies variations of corticosteroid-binding globulin parameters. *Domest Anim Endocrinol* 1996; 13(1): 35–45.

Geraghty AC, Kaufer D. Glucocorticoid regulation of reproduction. *Adv Exp Med Biol* 2015; 872: 253–78.

González-de-la-Vara Mdel R, Valdez RA, Lemus-Ramirez V, Vázquez-Chagoyán JC, Villa-Godoy A, Romano MC. Effects of adrenocorticotrophic hormone challenge and age on hair cortisol concentrations in dairy cattle. *Can J Vet Res* 2011; 75(3): 216–21.

Gould E, Mc Ewen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci* 1997; 17: 2492–8.

Gow R, Thomson S, Rieder M, Van Uum S, Koren G. An assessment of cortisol analysis in hair and its clinical applications. *Forensic Sci Int* 2010; 196(1/3): 32–7.

Hardy MP, Gao HB, Dong Q, Ge R, Wang Q, Chai WR, Feng X, Sottas C. Stress hormone and male reproductive function. *Cell Tissue Res* 2005; 322(1): 147–53.

Harkey MR. Anatomy and physiology of hair. *Forensic Sci Int* 1993; 63(1/3): 9–18.

Heimbürge S, Kanitz E, Otten W. The use of hair cortisol for the assessment of stress in animals. *Gen Comp Endocrinol* 2019; 270: 10–17.

Ito N, Ito T, Kromminga A, Bettermann A, Takigawa M, Kees F, Straub RH, Paus R. Human hair follicles display a functional equivalent of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and synthesize cortisol. *FASEB J* 2005; 19(10): 1332–4.

Johnsen JF, dePassille AM, Mejdell CM, et al. The effect of nursing on the cow–calf bond. *Animal Behaviour Science* 2015; 163: 50–57.

Johnsen JF, Zipp K, Kälber T, et al. Is rearing calves with the dam feasible option for dairy farms? - Current and future research. *Appl Anim Behav Sci* 2016; 181: 1–11.

Keckeis K, Lepschy M, Schöpfer H, Moser L. Hair cortisol: a parameter of chronic stress? Insights from a radiometabolism study in guinea pigs. *J Comp Physiol* 2012; 182(7): 985–96.

Kirschbaum C, Tietze A, Skoluda N, Dettenborn L. Hair as a retrospective calendar of cortisol production-increased cortisol incorporation into hair in the third trimester of pregnancy. *Psychoneuroendocrinology* 2009; 34: 32–7.

Kuhn CM, Schanberg SM. Responses to maternal separation : mechanisms and mediators. *Int J Dev Neurosci* 1998; 16: 261–70.

Lidfors ML. Behavioural effects of separating the dairy calf immediately or 4 days post-partum. *Anim Behav Sci* 1996; 49 (3): 269–83.

Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 1997; 277: 1659–62.

McEwen BS. Redefining neuroendocrinology: epigenetics of brain-body communication over the life course. *Front Neuroendocrinol* 2018; 49: 8–30.

Matteri RL, Carroll JA, Dyer CJ. Neuroendocrine responses to stress. In: Moberg GP, Mench JA, eds. *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. Wallingford: CAB International, 2000: 27–69.

Mormède P, Andanson S, Aupérin B, et al. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol Behav* 2007; 92(3): 317–39.

Nedić SN. Određivanje koncentracije kortizola i kortikosterona u dlaci i mleku krava kao indikatora stresa u uslovima tretmana antielktoparaziticima. Beograd: Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, 2018. Doktorska disertacija.

Noakes DE. *Fertility and obstetrics in cattle*. Oxford: Blackwell Science, 1997: 125.

Ogrizek M, Grgurevič N, Snoj T, Majdič G. Injections to pregnant mice produce prenatal stress that affects aggressive behavior in their adult male offspring. *Hormon Behav* 2018; 106: 35–43.

Palme R, Robia C, Mebmann S, Hofer J, Mostl E. Measurement of faecal cortisol metabolites in ruminants: A non-invasive parameter of adrenocortical function. *Wien Tierarz Monatsschr* 1999; 86: 237–41.

Phogat JB, Smith RF, Dobson H. Effect of adrenocorticotrophic hormone (ACTH¹⁻²⁴) on ovine pituitary gland responsiveness to exogenous pulsatile GnRH and oestradiol-induced LH release *in vivo*. *Anim Reprod Sci* 1999; 55(3/4): 193–203.

Retana-Marquez S, Bonilla-Jaime H, Vazquez-Palacios G, Martinez-Garcia R, Velazquez-Moctezuma J. Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. *Horm Behav* 2003; 44: 327–37.

Rhees RW, Lephart ED, Eliason D. Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproductive function. *Behav Brain Res* 2001; 123: 1–10.

Riad-Fahmy D, Read GF, Walker RF, Griffiths K. Steroids in saliva for assessing endocrine function. *Endocr Rev* 1982; 3(4): 367–95.

Roth BA, Barth K, Gygax L, Hillmann E. Influence of artificial vs. mother-bonded rearing on sucking behavior, health and weight gain in calves. *Appl Anim Behav Sci* 2009; 119: 143–50.

Roth LSV, Faresjö Å, Theodorsson E, Jensen P. Hair cortisol varies with season and lifestyle and relates to human interactions in German shepherd dogs. *Sci Rep* 2016; 6: e19631 (7 str.)

DOI: 10.1038/srep19631 (15.4.2019)

Russell E, Koren G, Rieder M, Van Uum S. Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology* 2012; 37(5): 589–601.

Salariya EM, Easton PM, Cater JJ. Duration of breast-feeding after early initiation and frequent feeding. *Lancet* 1978; 2(8100): 1141–3.

Sapolsky RM, Meaney MJ. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res Rev* 1986; 11: 65–76.

Schoenfield NM, Leatham JH, Rabii J. Maturation of adrenal stress response in the rat. *Neuroendocrinology* 1980; 31: 101–5.

Schwalm JW, Tucker HA. Glucocorticoids in mammary secretions and blood serum during reproduction and lactation and distributions of glucocorticoids, progesterone and estrogens in fractions of milk. *J Dairy Sci* 1978; 61(5): 550–60.

Slominski A, Wortsman J, Tuckey RC, Paus R. Differential expression of HPA axis homolog in the skin. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 265/266: 143–9.

Snoj T, Kobal S, Majdič G. Effects of season, age and breed on semen characteristic in different *Bos taurus* breeds in a 31-year retrospective study. *Theriogenology* 2013; 79: 847–52.

Šamanc H, Kirovski D. Adrenokortikalni sistem goveda. Beograd: Naučni institut za veterinarstvo, 2008.

Takase K, Yamamoto Y, Yagami T. Maternal deprivation in the middle of a stress hyporesponsive period decreases hippocampal calcineurin expression and causes abnormal social and cognitive behaviors in adult male Wistar rats: relevance to negative symptoms of schizophrenia. *Behav Brain Res* 2012; 232: 306–15.

Taves MD, Gomez-Sanchez CE, Soma KK. Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation and function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 301(1): 11–24.

Trevisi E, Bertoni G. Some physiological and biochemical methods for acute and chronic stress evaluation in dairy cows. *Italian journal of animal science* 2009; 8: 265–86.

Tucker HA, Schwalm JW. Glucocorticoids in mammary tissue and milk. *J Anim Sci* 1977; 45(3): 627–34.

Vänskä M, Punämäki RL, Tolvanen A, et al. Maternal pre- and postnatal mental health trajectories and child mental health and development: prospective study in normative and formerly infertile sample. *Int J Behav Dev* 2011; 35: 517–31.

Veenema AH, Blume A, Niederle D, Buwalda B, Neuman ID. Effects of early life stress on adult male aggression and hypothalamic vasopressin and serotonin. *Eur J Neurosci* 2006; 24: 1711–20.

Veenema AH, Bredewold R, Neuman ID. Opposite effects of maternal separation on intermale and maternal aggression in C57BL/6 mice: link to hypothalamic vasopressin and oxytocin immunoreactivity. *Psychoneuroendocrinology* 2007; 32: 437–50.

Venkatesh GK, Estergreen VL jr. Cortisol and corticosterone in bovine plasma and the effect of adrenocorticotropin. *J Dairy Sci* 1970; 53(4): 480–3.

Wagner K, Seitner D, Barth K, Palme R, Futschik A, Waiblinger S. Effects of mother versus artificial rearing during the first 12 weeks of life on challenge response in dairy cows. *Appl Anim Behav Sci* 2015; 164: 1–11.

Weaver IC. Epigenetic programming by maternal behavior and pharmacological intervention. Nature versus nurture: let's call the whole thing off. *Epigenetics* 2007; 2(1): 22–8.

Webster AJ. Environmental stress and the physiology, performance and health of ruminants. *J Anim Sci* 1983; 57(6): 1584–93.

Wester VL, van der Wulp NR, Koper JW, de Rijke YB, van Rossum EF. Hair cortisol and cortisone are decreased by natural sunlight. *Psychoneuroendocrinology* 2016; 72: 94–6.

Widström AM, Wahlberg V, Matthiesen AS, et al. Short-term effects of early suckling and touch of the nipple on maternal behaviour. *Early Hum Dev* 1990; 21(3): 153–63.