

## ORIGINALNI RAD / ORIGINAL PAPER

DOI: 10.2298/VETGL1404151D UDK: 661.691+636.087: 616.151+613.287.5: 618.19+616-092.11

**UTICAJ DODAVANJA SELENA I CINKA U HRANI NA KONCENTRACIJU  
OVIH ELEMENATA U KRVI I MLEKU, BROJ SOMATSKIH ČELIJA I  
HISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE VIMENA KRAVA\***  
**THE INFLUENCE OF SELENIUM AND ZINC ADDITION IN FOOD ON CONCENTRATION  
OF THESE ELEMENTS IN BLOOD AND MILK, ON SOMATIC CELLS NUMBER AND  
HISTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF COWS UDDERS**

Davidov Ivana, Cincović M. R., Radinović M., Erdeljan M., Belić Branislava,  
Toholj B., Stevančević M.\*\*

*U eksperiment je uključeno 30 krava holštajn-frizijske rase. 15 krava je primalo selen i cink u optimalnoj dozi u periodu pre teljenja, dok je drugih 15 krava odabrano iz grupe krava koje nikada tokom života nisu bile suplementirane ovim mikroelementima. Analizirana je koncentracija selena i cinka u krvnom i mlečnom serumu, kao i prosečan broj somatskih ćelija u pripadajućoj laktaciji. Posle isključenja krava iz proizvodnje ispitana su histološka svojstva vimena krava. Rezultati ispitivanja pokazuju da dodavanje selena i cinka kod krava u periodu pred teljenje pozitivno utiče na vrednost ovih mikroelemenata u krvi i mleku tokom rane laktacije, tako da je koncentracija ovih elemenata značajno viša u mleku i krvi kod krava koje su dobijale suplemente selena i cinka. Kod krava kojima su u hranu dodavani ovi mikroelementi postoji značajno manji prosečan broj somatskih ćelija tokom laktacije koja sledi. Nađena je manje izražena infiltracija parenhima vimena leukocitima, značajno deblji keratinski sloj ductus papillaris-a i manje izraženi reparacioni procesi koji ukazuju na hroničnu inflamaciju vimena u preparatima dobijenim posle isključenja krava iz proizvodnje. Postoji značajna pozitivna korelacija između selena u krvi i mleku, dok takva korelacija nije pokazana za vrednosti cinka. Postoji značajna negativna korelacija između koncentracije selena u krvi i mleku sa prosečnim brojem somatskih ćelija i stepenom leukocitne infiltracije, dok uticaj na keratinski sloj ductus papillaris-a nije pokazan. Cink iz kr-*

\* Rad primljen za štampu 01. 07. 2013. godine

\*\* Dr sci. vet. med. Ivana Davidov, docent, dr sci. vet. med. Marko R. Cincović, asistent, dr sci. vet. med. Miodrag Radinović, docent, MSc Mihajlo Erdeljan, asistent, dr sci. med. Branislava Belić, vanr. prof., dr sci. vet. med. Bojan Toholj, docent, dr sci. vet. med. Milenko Stevančević, red. prof., Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.

*vi i vimena negativno korelira sa brojem somatskih ćelija, dok pozitivno korelira sa debljinom keratinskog sloja ductus papillaris-a, a nema uticaja na stepen infiltracije parenhima vimena leukocitima. Cink pokazuje pozitivan uticaj na formiranje keratinskog sloja ductus papillaris-a i štiti vime od prodora uzročnika, dok selen utiče na imunološki odgovor vimena. Njihovo pozitivno dejstvo moglo bi se okarakterisati kao aditivno, jer iako deluju na morfološki dva odvojena dela vimena, davanje i jednog i drugog elementa značajno smanjuje broj somatskih ćelija u mleku krava.*

*Ključne reči: selen, cink, mlečne krave, mastitis, histologija vimena*

#### Uvod / Introduction

Adekvatna ishrana bogata mineralima obezbeđuje optimalno funkcionisanje imunološkog odgovora i samim tim ima pozitivno dejstvo na očuvanje zdravlja i otpornost mlečne žlezde na pojavu mastitisa (Weiss i Wyatt, 2002). Mikroelementi kao što su selen i cink imaju esencijalan značaj u očuvanju zdravlja i produktivnosti vimena krava (Andrieu, 2008). Ovi mikroelementi su prvenstveno ćelijski antioksidansi, čija se aktivnost odvija u ćelijskoj citoplazmi gde sprečavaju oštećenje ćelije dejstvom peroksidaza. Takođe, ovi antioksidansi imaju i esencijalan značaj u funkcionisanju imunološkog odgovora (Miller i sar., 1993). Slabljenje imunološkog sistema muznih krava je u vreme partusa i tada se povećava rizik od nastajanja infekcija (Mallard i sar., 1998). To može da nastane zbog pada koncentracije cinka u krvi u tom periodu (Goff i Stabel, 1990; Meglia i sar., 2001), a Miller i sar. (1995), su u svojim istraživanjima uočili da u vreme partusa dolazi do pada koncentracije selena u krvi. Nekontrolisano stvaranje peroksida je vrlo štetno za zdrave ćelije i zdravo tkivo mlečne žlezde (Kommisrud i sar., 2005). Selen je neophodan kao pomoć leukocitima da redukuju perokside koji su stvoreni da ih prevedu u bezbedne materije i zatim da utiču na uništenje invadiranih patogena (Larsen, 1993; Finch i Turner, 1996; Smith i sar. 1997; McKenzie i sar., 1998). Uloga cinka je i u rastu ćelija i tkiva, u ćelijskog replikaciji, u formiranju kostiju, u očuvanju integriteta kože, u procesima keratinizacije, u celularnom imunitetu i uopšte u odbrani organizma. Mlečnoj žlezdi kao organu koji predstavlja derivat kože, neophodan je cink (Tomlison i sar., 2004, 2008), zbog formiranja keratinskog sloja u *ductus papillaris-u*.

Sordillo i sar. (1997) smatraju da postoje dva načina kojima mikroelementi utiču na očuvanju mlečne žlezde. Prvi je da pojačavaju aktivnost prve linije odbrane mlečne žlezde od prodora mikroorganizama kao i da pojačavaju odbrambenu sposobnost epitelnih ćelija za borbu protiv mikroorganizama koji penetriraju ka mlečnoj žlezdi. Drugi način je u pojačavanju fagocitnog mehanizma na mestu prodora mikroorganizma u mlečnu žlezdu.

Cilj ovog rada je da se ispita uticaj dodavanja selena i cinka u hrani na koncentraciju selena i cinka u krvi i mleku, broj somatskih ćelija u ranoj laktaciji kao i histološke karakteristike vimena krava značajne za procenu zdravlja vimena po isključenju krava iz proizvodnje.

## Materijal i metode / *Material and methods*

### *Životinje / Animals*

U eksperiment je uključeno 30 visoko-mlečnih krava Holštaj-frizijske rase koje su praćene tokom celog ciklusa laktacije, i koje su držane u štalskim uslovima. Sve krave su bile približne telesne građe i mase, starosti od 3-4 laktacije i davale su približno istu količinu mleka (oko 7000 l/laktaciji). Postojale su dve grupe po 15 krava. Prvu grupu su činile krave kojima nikada tokom prethodnih laktacija nisu davani dodaci selena i cinka, a druga je ogledna koja je dobijala organski cink i selen u hrani u periodu 14-21 dan pre teljenja (komplekse Bioplex Zinc 240 mg/kg hrane i Sel-Plex 0,30 mg/kg hrane; Alltech). Ishrana krava u periodu zasušenosti zasniva se na sledećem (kg): kukuruzna silaža (15), seno lucerke (2), suncokretova sačma (0,5), zrno kukuruza (2), suvi repin rezanac (1), premiks (0,1). Suva materija je na nivou oko 57% (oko 12 kg). Prema kalkulaciji dnevni unos selena iznosi 0,2 mg/kg suve materije (a preporuka prema NRC-u 0,3), a dnevni unos cinka iznosi oko 30 mg/kg suve materije (a preporuka prema NRC-u je 40-50). Dakle u obroku su postojale suboptimalne vrednosti selena i cinka.

### *Analiza krvi / Blood analysis*

Krv je uzeta u prvom mesecu laktacije (oko 30 dana) iz *v.coccygea* kako bi se odredila koncentracija selena i cinka u krvi. Kada su prikupljeni svi uzorci krvi, krvni serumi su dalje analizirani atomskom apsorpcionom spektrometrijom (AAS) na aparatu Perkin Elmer Elan 6100 ICPMS, Massachusetts, USA. Koncentracija selena i cinka određena je prema postupku koji su opisali Tamasi i sar. (2008) i Maas i sar. (1992).

### *Analiza mleka / Analysis of milk*

Mleko je za potrebe eksperimenta uzeto u momentu kada je uzorkovana i krv. Pomoću Milkoscan aparata određen je broj somatskih ćelija. Kada su prikupljeni svi uzorci mleka, mlečni serumi su izdvojeni i dalje analizirani atomskom apsorpcionom spektrometrijom (AAS) na aparatu Perkin Elmer Elan 6100 ICPMS, Massachusetts, USA. Metodologija je ista kao i za krvni serum.

### *Histološka analiza vimena / Histological analysis of udder*

Vimena 30 krava Holštajn-frizijske rase uzimana su za histološka ispitivanja, po isključenju ovih krava iz proizvodnje. Za ispitivanje su korišćene 120 četvrti vimena krava, kojima je merena dužina papila i dužina *ductus papillaris-a*, i od kojih su uzeti uzorci tkiva za histološki pregled. Analiza histoloških preparata je rađena

na *Leica* mikroskopu. Čaklijeva kvantitativna metoda, koju opisuju Mayer i Klein (1961) je korišćena radi procena stepena oštećenja alveolarnog epitela, alveolarnog lumena i intraalveolarne strome. Leukocitarna infiltracija, uglavnom limfocita i polimorfonuklearnih neutrofilnih granulocita (PMN) je kategorizovana u dva područja vimena krava: 1. cisterna i 2. parenhim. Promene su utvrđene na uveličanju svetlosnog mikroskopa od 10x i 40x. Stepen leukocitarnog infiltrata smo utvrdili na osnovu prisutnosti određenih ćelija zapaljenskog odgovora u vidnom polju, gde nekoliko neutrofilnih granulocita i limfocita predstavlja leukocitarni infiltrat od 0% do 25%; značajan broj neutrofilnih granulocita i limfocita sa retkim makrofagama je leukocitarni infiltrat od 25,1% do 50%; masivna infiltracija limfocita, značajan broj makrofaga i retki eozinofilni granulociti su leukocitarni infiltrat od 50,1% do 75%; i masivna infiltracija limfocita i makrofaga sa nekoliko plazmocita i eozinofilnih granulocita predstavlja leukocitarni infiltrat od 75,1% do 100%. Reparacioni procesi podrazumevali su nalaz granuloma i hipertrofiju/hiperplaziju vezivnog tkiva žlezdanog dela vimena.

#### *Statistička analiza podataka / Statistical data analysis*

Razlike u koncentraciji selena i cinka u krvi odnosno mleku kod krava koje su dobijali ove mikroelemente i koje nisu dobijale određen je pomoću t-testa. Veza između dodavanja selena i cinka kao i zastupljenosti krava sa deficitom selena i cinka u ranoj laktaciji određena je Hi-kvadrat testom. Značajnost razlike u broju somatskih ćelija između odgledne i kontrolne grupe određena je t-testom, dok je veza između dodavanja selena i cinka i pojave broja somatskih ćelija preko 400.000/ml određena Hi-kvadrat testom. Uticaj dodavanja selena i cinka na debljinu *ductus papillaris*-a, stepen ćelijske infiltracije i nalaz reparacionih procesa ispitan je pomoću Cochran-Armitage testa za trend (određeno je za svaku ispitivanu četvrt vimena posebno). Ispitana je i korelacija i testirana značajnost korelacije između koncentracije selena i cinka u krvi i mleku, broja somatskih ćelija, stepena celularne infiltracije i debljine keratinskog sloja.

#### **Rezultati / Results**

Rezultati ispitivanja pokazuju da dodavanje selena i cinka kod krava u periodu pred teljenje pozitivno utiče na vrednost ovih mikroelemenata u krvnom serumu i mleku tokom rane laktacije, tako da je koncentracija ovih elemenata značajno viša u mleku i krvi kod krava koje su dobijale suplemente selena i cinka. Kod krava suplementiranih ovim mikroelementima postoji značajno manji prosečan broj somatskih ćelija tokom laktacije koja sledi. Nađena je manje izražena infiltracija parenhima vimena leukocitima, značajno deblji keratinski sloj *ductus papillaris*-a i manje izraženi reparacioni procesi koji ukazuju na hroničnu inflamaciju

vimena u preparatima dobijenim posle isključenja krava iz proizvodnje. Navedeni rezultati predstavljeni su u tabeli 1.

Tabela 1. Razlike u vrednostima ispitivanih parametara kod krava koje su dobijale i koje nisu dobijale selen i cink u hrani pre teljenja /  
Table 1. Differences in values of the examined parameters in cows which did and did not receive selenium and zinc in food before calving

	Krave / Cows		P
	suplementirane / supplemented	nesuplementirane / non supplemented	
Selen u krvi (µmol/l) / Selenium in the blood	0,69±0,12	0,51±0,16	<0.01
Selen u mleku (µmol/l) / Selenium in milk	0,63±0,2	0,09±0,025	<0.01
Cink u krvi (µmol/l) / Zinc in the blood	13,59±4,5	10,93±3,49	<0.05
Cink u mleku (µmol/l) / Zinc in milk	33,1±7,3	24,78±8,21	<0.05
Broj somatskih ćelija (000/ml) / Number of somatic cells	380±150	479±110	<0.05
Keratinski sloj <i>d.papillaris</i> -a (µm) / Keratin layer of <i>d.papillaris</i>	303,5±15,20	241,7±20,24	<0.01
Infiltracija leukocita u parenhim vimena (%) / Infiltration of leukocytes in parenchyma of the udder	38,5±15,7	65,5±19,1	<0.01
Reparacioni procesi (broj granuloma u preparatu) / Repairing processes (number of granuloma in the preparation)	3,5±1,5	7±2,2	<0.01

Dodavanje selena i cinka kroz hranu je u vezi sa statusom selena i cinka kod ispitivanih krava, jer u grupi krava koje nisu dobijale ove elemente postoji značajno veće učešće krava koje imaju deficit ovih elemenata u krvi. Kod krava kojima su u hrani bili dodavani ovi mikroelementi postoji značajno manje učešće onih krava čija je prosečna vrednost broja somatskih ćelija bila preko 400.000/ml. Histološke karakteristike vimena krava takođe su u značajnoj vezi sa dodavanjem selena i cinka, tako da kod onih koje su dobijale ove suplemente postoji trend povećanja broja krava sa niskom celularnom infiltracijom parenhima, kao i trend povećanja broja krava čija je debljina *ductus papillaris*-a preko 200 µm. Reparacioni procesi u smislu nalaza granuloma i hiperplazije/hipertrofije vezivnog tkiva izraženiji su u grupi krava koje nisu dobijale selen i cink u hrani. Svi rezultati su prikazani u tabeli 2. Mikrofotografije karakterističnih nalaza u vezi sa histologijom vimena (keratinskim slojem *ductus papillaris*-a, infiltracije leukocita u perialveolarnom prostoru uz dilataciju alveola, deskvamaciju epitela, sakupljanje imunoloških ćelija u alveolarnom prostoru i reparacioni procesi) prikazani su na slikama 1-4.

Tabela 2. Ispitivanje veze između dodavanja selena i cinka u hrani sa nalazom deficitarnih stanja, subkliničkog mastitisa, nivoa ćelijske infiltracije, debljine keratinskog sloja i prisustva reparacionih procesa u vimenu krava

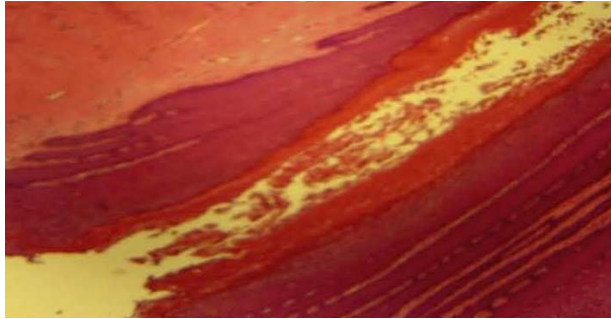
Table 2. Analysis of the relation between selenium and zinc adding in food and findings of deficiency conditions, subclinical mastitis, level of cells infiltration, thickness of keratin layer and reparation processes in cows udders

	Krave / Cows		p	
	suplementirane / supplemented	nesuplementirane / non supplemented		
Relacija sa deficitarnim Se / Relation with deficient Se Broj i % deficitarnih / Number and % of the deficient	3 (20%)	8 (53,33%)	<0.01	
Relacija sa deficitarnim Zn / Relation with deficient Zn Broj i % deficitarnih / Number and % of the deficient	4 (26,67%)	9 (60%)	<0.01	
Relacija sa znacima mastitisa preko 400.000 / Relation with mastitis indicators over 400 000	4 (26,67%)	10 (66,67%)	<0.05	
Keratinski sloj mikrometar / Keratin layer Micrometers	do 100	8	24	<0.01
	101-200	20	28	
	>200	32	8	
Leukocitna infiltracija % / Leukocytes infiltration %	0-25	20	8	<0.01
	26-50	20	16	
	51-75	12	20	
	76-100	8	12	
Reparacioni procesi prisutni / Repairing processes present	20	44	<0.01	

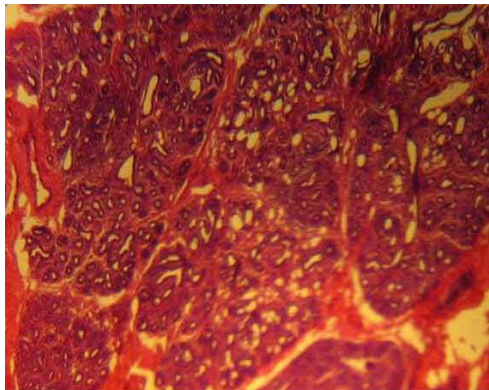
Tabela 3. Koeficijenti korelacije i njihov statistički značaj između ispitivanih parametara

Table 3. Correlation coefficient and its statistical significance between the investigated parameters

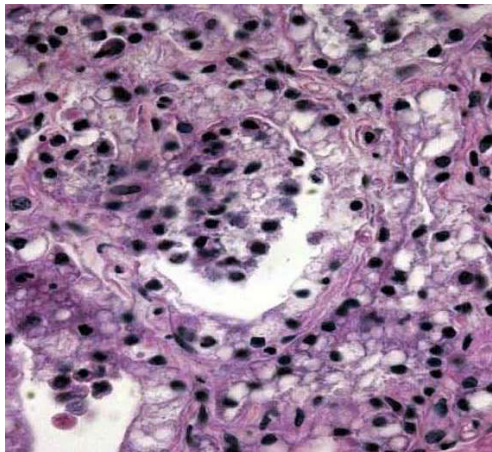
	Selen u krvi / Selenium in the blood	Cink u krvi / Zinc in the blood	Selen u mleku / Selenium in milk	Cink u mleku / Zinc in milk	Broj somat. ćelija / Number of somatic cells	Keratinski sloj / Keratin layer	Infiltracija leukocita / Leukocytes infiltration
Selen u krvi / Selenium in the blood	–	NS	0,51 <0.05	NS	-0,59 <0.05	NS	-0,68 <0.01
Cink u krvi / Zinc in the blood		–	NS	NS	-0,58 <0.05	0,81 <0.01	NS
Selen u mleku / Selenium in milk			–	NS	-0,55 <0.05	NS	-0,73 <0.01
Cink u mleku / Zinc in milk				–	-0,53 <0.05	0,67 <0.01	NS
Broj somat. ćelija / Number of somatic cells					–	-0,59 <0.05	0,82 <0.01
Keratinski sloj / Keratin layer						–	-0,55 <0.05
Infiltracija leukocita / Leukocytes infiltration							–



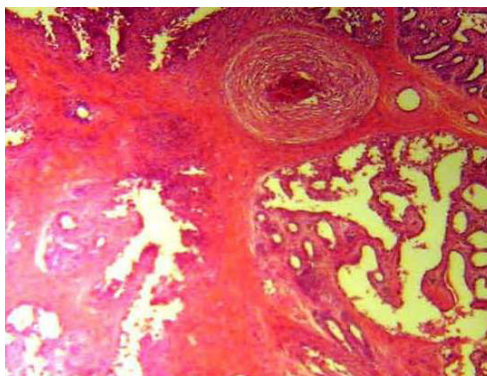
Slika 1. Keratinski sloj ductus papillaris-a  
Figure 1. Keratin layer of ductus papillaris



Slika 2. Intersticijalna infiltracija preko 75% u perialveolarnom prostoru  
Figure 2. Interstitial infiltration over 75% in perialveolar space



Slika 3. Deskvamacija epitela i makrofage – somatske ćelije u lumenu alveole  
Figure 3. Desquamation of epithelium and macrophage-somatic cells in lumen of the alveoli



Slika 4. *Reparacioni procesi – granulom sa hipertrofijom vezivnih septi*  
Figure 4. *Repairing process – granuloma with hypertrophy of the connective septa*

Korelacije između ispitanih parametara takođe su testirane. Postoji značajna pozitivna korelacija između koncentracije selena u krvnom serumu i mleku, dok takva korelacija nije pokazana za vrednosti cinka. Postoji značajna negativna korelacija između koncentracije selena u krvi i mleku sa prosečnim brojem somatskih ćelija i stepenom leukocitne infiltracije parenhima vimena, dok uticaj na keratinski sloj *ductus papillaris*-a nije pokazan. Cink iz krvi i vimena negativno korelira sa brojem somatskih ćelija, dok pozitivno korelira sa debljinom keratinskog sloja *ductus papillaris*-a, dok nema uticaja na stepen infiltracije parenhima vimena leukocitima. Debljina *stratum corneum*-a negativno korelira sa brojem somatskih ćelija i stepenom infiltracije leukocita. Nađena je pozitivna korelacija između broja somatskih ćelija i stepena leukocitne infiltracije. Svi rezultati prikazani su u tabeli 3.

#### Diskusija / Discussion

Fiziološke vrednosti koncentracije selena u krvnom serumu koje su nađene kod krava bile su u rasponu od 0,6 do 0,9  $\mu\text{mol/l}$  (Erdeljan i sar., 2011; Gunter i sar., 2003; Juniper i sar., 2006). Aplikacija selena dovodi do značajnog porasta njegove koncentracije u krvi i mleku, ali to zavisi od doze, vremena aplikacije i vrste izvora selena (Ran i sar., 2010). Koncentracija selena u mleku kod suplementiranih krava iznosi od 0,117 do 0,2  $\mu\text{mol/l}$  (Ceballos i sar., 2009), sa čime se slažu naši rezultati. Koncentracija cinka u krvnom serumu koja je nađena iznosi oko 12  $\mu\text{mol/l}$  (Davidov i sar., 2013; Ismail i sar., 2011; Pavlata i sar., 2005). Niže vrednosti selena i cinka nađene su u periodu zasušenja i na početku laktacije da bi njihova vrednost kasnije rasla (Meglia i sar., 2004; Van Ryn, 2009). Naši rezultati su u skladu sa navedenim ranijim rezultatima.

Koncentracija selena i cinka u krvi i mleku negativno korelira sa brojem somatskih ćelija u mleku krava, dok je aplikacija selena i cinka u značajnoj vezi sa procentom krava koje imaju vrednost broja somatskih ćelija preko 400.000/ml.



Aplikacija selena dovodi do redukcije subkliničkog mastitisa i smanjenja broja somatskih ćelija kod mlečnih krava (Barbano i sar., 2006; Cope i sar., 2009; Rabiee i sar., 2010; Weis i sar., 2002; Davidov i sar., 2012). U istraživanju koji je izveo Van Saun (2009) na dvanaest krava u laktaciji, koje su u hrani dobijale dodatak organskog cinka, uočeno je da je u 33% krava došlo do redukcije broja somatskih ćelija u mleku krava. Krave sa višom koncentracijom selena i cinka pokazuju niži broj somatskih ćelija u mleku, kako u početku tako i na sredini laktacije (Davidov i sar., 2012).

Uticaj selena na broj somatskih ćelija u mleku i histološke karakteristike vimena može se objasniti na sledeći način. Prodor bakterija i njihov rast u mlečnoj žlezdi glavni su uzrok nastajanja mastitisa kod krava (Mukherjee, 2008). Nakon prodora bakterija dolazi do niza kaskadnih reakcija. Prvo, neutrofilni granulociti iz krvi dolaze do mesta infekcije uz narušavanje krvno-mlečne barijere (Zhao i Lacasse, 2008). Neutrofilni granulociti su prva linija odbrane organizma od prodora bakterija. Funkcija neutrofilnih granulocita je u fagocitovanju i uništavanju bakterija. Nakon fagocitovanja bakterija, nastaje niz hemijskih reakcija uništavanja bakterije, pri čemu se oslobađaju citotoksični slobodni radikali i proinflamatorni citokini (Knaapen i sar., 1999). Inflamatorne materije nastale oslobađanjem visoko reaktivnih molekula ublažuju se antioksidansima koji predstavljaju intracelularni mehanizam odbrane od oksidacije. Superoksid dismutaza, glutation peroksidaza i katalaza u mlečnoj ćeliji, uklanjaju superokside i prokside pre nego što oni stupe u reakciju sa metalnim katalizatorima ćelije i stvore razorna toksična jedinjenja za ćeliju. Ovaj intracelularni mehanizam odbrane dovodi da smanjenja oštećenja mlečne ćelije tokom akutne faze inflamacije (Ndiveni i sar., 1991; Fuchs i Milbradt, 1994). Sordillo i sar. (1997) su uočili da pojedini vitamini i mikroelementi imaju značaja u poboljšavanju imunološkog sistema mlečne žlezde, pošto su Atroshi i sar. (1986) i Hogan i sar. (1993) u svojim istraživanjima zaključili da do pojave mastitisa dolazi kod krava čiji je nivo glutacion peroksidaze i vitamina E u plazmi vrlo nizak. Dodavanjem u hrani vitamina E i selena, dolazi do pojačavanja aktivnosti glutacion peroksidaze i redukcije pojave mastitisa (Hemmingway, 1999; Weiss i sar., 1997). Ustanovljeno je da nizak nivo glutacion peroksidaze smanjuje antioksidativnu sposobnost odbrambenog sistema mlečne žlezde i dovodi do pojave mastitisa i povećanja broja somatskih ćelija u mleku (Mukherjee, 2008). Koncentracija selena i aktivnost glutacion peroksidaze međusobno pozitivno koreliraju (Pilarczyk i sar., 2012). Selen je sastavni deo ovog enzima, pa bi se time moglo objasniti zbog čega krave koje nisu dobijale selen imaju veću infiltraciju inflamatornih ćelija sa izraženim upalnim procesima. Nedostatak selena provocira inflamatorne procese zbog smanjene antioksidativne aktivnosti tkiva, kada dolazi do nagomilavanja imunih ćelija kao odgovor na prolongiranu inflamaciju, pa zbog toga koncentracija selena negativno korelira sa stepenom celularne infiltracije u parenhimu vimena krava.

Kinal i sar. (2005) i Cortinhas i sar. (2010) su dali odgovor zašto dolazi do smanjenja broja somatskih ćelija u mleku koje su kao suplemenat u hrani dobijale

organski cink. Odgovor je, da je došlo do bržeg formiranja keratinskog sloja *ductus papillaris*-a i samim tim bržeg njegovog zatvaranja kod krava hranjenim suplementom organskog cinka. Glavnu odbrambenu ulogu u *ductus papillaris*-u čini keratin, koji ga oblaže. Keratinozne deskvamirane epitelne ćelije *ductus papillaris*-a stvaraju materiju sličnu vosku, koja lepi patogene mikroorganizme za keratin i tako onemogućava njihov prodor u cisternu i parenhim vimena krava. Paulrud i sar. (2004) smatraju da keratinski sloj *ductus papillaris*-a predstavlja njegovu fizičku barijeru i samim tim sprečava prodor potencijalnih patogenih mikroorganizama u mlečnu žlezdu. Snižena koncentracija cinka ispod 9,64  $\mu\text{mol/l}$  dovodi do stanjenja keratinskog sloja *ductus papillaris*-a za polovinu čime se značajno smanjuje otpornost vimena (Davidov i sar., 2013). Ovakvi rezultati potkrepljuju naše nalaze u kojima koncentracija cinka u mleku i krvi pozitivno korelira sa debljinom keratinskog sloja *ductus papillaris*-a, kao i rezultate koji pokazuju zašto sa opadanjem debljine keratinskog sloja *ductus papillaris*-a raste broj somatskih ćelija i stepen ćelijske infiltracije parenhima vimena.

Patohistološke karakteristike vimena koje su ispitivane u našem ogledu predstavljaju karakteristične znake upalnih procesa i odlikuju se nalazima kao što je edem, oštećenje epitela sekretornih ćelija parenhima i leukocitarna infiltracija različitog stepena uz pojavu reparacionih procesa (granulomi i fibroza vezivnih septi) (Jovanović i sar., 2012). Benites i sar. (2002) su histološki pregledali 184 parenhima vimena krava, koje su poslate na ekonomsko iskorišćavanje. Takođe su radili i izolaciju uzročnika koji su doveli do određenih promena u parenhimima krava. Od svih uzoraka gde su izolovani uzročnici, samo se u 3,1% uzoraka nisu uočili patohistološke promene. U ostalih 96,9% uzoraka su bile uočljive komponente zapaljenja koje su pokazane i u našem radu.

#### Zaključak / Conclusion

Aplikacija selena i cinka putem hrane u periodu pre telenja dovodi do porasta koncentracije ovih mikroelemenata u krvnom serumu i mleku kod krava u ranoj laktaciji. Krave koje dobijaju pomenute mikroelemente u hrani imaju prosečno niži broj somatskih ćelija u mleku, manji stepen leukocitne infiltracije parenhima vimena, deblji keratinski sloj *ductus papillaris*-a i manje izražene reparacione procese, pokazatelje hronične inflamacije. Sve navedeno pokazuje da postoji pozitivan efekat aplikacije selena i cinka na zdravlje vimena. Selen značajno negativno korelira sa stepenom leukocitne infiltracije u parenhimu vimena, dok cink značajno pozitivno korelira sa debljinom keratinskog sloja *ductus papillaris*-a. Njihovo pozitivno dejstvo bi se moglo okarakterisati kao aditivno, jer iako deluju na morfološki dva odvojena dela vimena, dodavanje jednog i drugog elementa značajno smanjuje broj somatskih ćelija u mleku krava.

#### NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Ovaj rad je deo projekta TR31062 finansiranog od strane Ministarstva prosvete i nauke R. Srbije. / This work is a part of the project TR1062 funded by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia

## Literatura / References

1. Andrieu S. Is the role for organic trace element supplements in transition cow health? *Vet J* 2008; 176: 77-83.
2. Atroshi F, Parantainen J, Sankari S, Osterman T. Prostaglandin and glutathione peroxidase in bovine mastitis. *Res Vet Sci* 1986; 40: 361-6.
3. Barbano DM, Ma Y, Santos MV. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. *J Dairy Sci* 2006; 89: 15-9.
4. Benites NR, Guerra JL, Melville PA, da Costa EO. Aetiology and histopathology of bovine mastitis of a spontaneous occurrence. *J Vet Med* 2002; B49: 366-70.
5. Ceballos A, Sánchez J, Stryhn H, Montgomery JB, Barkema HW, Wichtel JJ. Meta analysis of the effect of oral selenium supplementation on milk selenium concentration in cattle. *J Dairy Sci* 2009; 92: 324-42.
6. Cope CM, Mackenzie AM, Wilde D, Sinclair LA. Effects of level and form of dietary zinc on dairy cow performance and health. *J Dairy Sci* 2009; 92: 2128-35.
7. Cortinhas CS, Botaro BG, Sucupira MCA, Renno FP, Santos MV. Antioxidant enzymes and somatic cell count in dairy cows fed with organic source of zinc, copper and selenium. *Livestock Sci* 2010; 127: 84-7.
8. Davidov I, Radinović M, Erdeljan M, Belić B, Cincović MR, Boboš S. Blood selenium concentration, somatic cell count and their correlation at first and sixth month of lactation in dairy cows. *Contemporary agriculture* 2012; 61(1-2): 95-103.
9. Davidov I, Radinović M, Erdeljan M, Cincović MR, Stančić I, Belić B. Relations between blood Zinc concentrations and udder health in dairy cows. *Rev Med Vet* 2013; 164(4): 183-90.
10. Erdeljan M, Davidov I, Boboš S, Radinović M, Stančić I. Nalaz nivoa selena u krvnom serumu kod krava u laktaciji. *Letopis naučnih radova Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu* 2011; 35(1): 104-9.
11. Finch JM, Turner RJ. Effects of selenium and vitamin E on the immune response of domestic animals. *Res Vet Sci* 1996; 60:97-106.
12. Fuchs J, Milbradt R. Antioxidant inhibition of skin inflammation induced by reactive oxidants: evaluation of the radox couple dihydroliipoate/liipoate. *Skin Pharma* 1994; 7: 278-84.
13. Goff JP, Stabel JR. Decreased plasma retinol,  $\alpha$ -tocopherol and Zn concentration during the periparturient period: effect of milk fever. *J Dairy Sci* 1990; 73:3195-99.
14. Gunter SA, Beck PA, Phillips JM. Effects of supplementary selenium source on the performance and blood measurements in beef cows and their calves. *J. Anim Sci* 2003; 81: 856-64.
15. Hemmingway RG. The influences of dietary selenium and vitamin E intakes on milk defense responses to mastitis. *J Dairy Sci* 1999; 76: 2795-803.
16. Hogan JS, Weiss WP, Smith KL. Role of vitamin E and selenium in host defense against mastitis. *J Dairy Sci* 1993; 76: 2795-803.
17. Ismail S, Ben Romdhane S, Ibn Hadj Slama J, Romdane MN. Carences en cuivre et en zinc chez les bovins de la région de Béja : relations sol-plante-animal. *Rev Méd Vét* 2011; 162(10): 468-74.
18. Jovanović M, Aleksić-Kovačević S, Knežević M. Specijalna veterinarska patologija. Fakultet veterinarske medicine Beograd, 2012: 245-8.
19. Juniper DT, Phipps RH, Jones AK, Betrin G. Selenium supplementation of lactating dairy cows: effect on selenium concentration in blood, milk, urine and feces. *J Dairy Sci* 2006; 89: 3544-51.
20. Kinal S, Korniewicz A, Jamroz D, Zieminski R, Slupezynska M. Dietary effects of zinc, copper and manganese chelates and sulphates on dairy cows. *J Food Agric Environ* 2005; 3:168-72.
21. Knaapen AM, Nehls P, Borm AJ. Neutrophils cause oxidative DNA damage in alveolar epithelial cells. *Free Rad Bio Med* 1999; 27:234-40.

22. Kommissrud E, Osteras O, Vatn T. Blood selenium associated with health and fertility in Norwegian dairy herds. *Acta Vet Scand* 2005; 46: 229-40.
23. Larsen HJS. Relation between selenium and immunity. *Nor J Agric Sci* 1993; 11: 105-19.
24. Maas J, Galey FD, Peuroi JR, Case JT, Littlefield ES, Gay CC, Koller LD, Crisman RO, Weber DW, Warner DW, Tracy ML. The correlation between serum selenium and blood selenium in cattle. *J Vet Diagn Invest* 1992; 4: 48-52.
25. Malard BA, Dekkers JC, Ireland JM, Leslie KE, Sharif S, Lacey VC, Wacter L, Wilkie BN. Alteration in immune responsiveness during the periparturient period and its ramification on dairy cow and calf health. *J Dairy Sci* 1998; 81: 585-95.
26. Mayer G, Klein M. Histology and cytology of the mammary gland, U Kon SK, Cowie AT, editors. *Milk: the mammary gland and its secretion* (Vol. 1). New York: Academic Press, 1961.
27. McKenzie RC, Rafferty TS, Beckett GJ. Selenium: an essential element for immune function. *Immunol Today* 1998; 19: 342-5.
28. Meglia GE, Holtenius K, Petersson L, Ohagen P, Persson Waller K. Prediction of vitamin A, vitamin E, selenium and zinc status of periparturient dairy cows using blood sampling during the mid dry period. *Acta Vet Scand* 2004; 45: 119-28.
29. Meglia GE, Johannisson A, Petersson L, Persson Walker K. Changes in some blood micronutrients, leukocytes and neutrophil expression of adhesion molecules in periparturient dairy cows. *Acta Vet Scand* 2001; 42: 109-20.
30. Miller GY, Bartlett PC, Erskine RJ, Smith KL. Factors affecting serum selenium and vitamin E concentration in dairy cows. *JAVMA* 1995; 206: 1369-73.
31. Miller JK, Brzezinska-Slebodzinska E, Madsen FC. Oxidative stress, antioxidants and animal function. *J Dairy Sci* 1993; 76: 2812-23.
32. Mukherjee R. Selenium and vitamin E increases polymorphonuclear cell phagocytosis and antioxidant levels during acute mastitis in riverine buffaloes. *Vet Res Commun* 2008; 32: 305-13.
33. Ndiveni N, Field TR, Williams MR, Booth JM. Studies on the incidence of clinical mastitis and blood levels of vitamin E and selenium in dairy herds in England. *Vet Rec* 1991; 129: 86-8.
34. NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL): Nutrient requirements of Dairy Cattle, National Academic Press, Washington, DC, 2001.
35. Paulrud CO, Thamsborg SM, Enevoldsen C, Rasmussen MD. Effect of three different liners on heifer teat canal keratin. *J Dairy Res* 2004; 72: 255-7.
36. Pavlata L, Podhorsky A, Pechova A, Chomat P. Differences in the occurrence of selenium, copper and zinc deficiencies in dairy cows, calves, heifers and bulls. *Vet Med Czech* 2005; 50(9): 390-400.
37. Pilarczyk B, Jankowiak D, Tomza-Marciniak A, Pilarczyk R, Sablik P, Drozd R, Tylkowska A, Skólmowska M. Selenium concentration and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity in serum of cows at different stages of lactation. *Biol Trace Elem Res* 2012; 147(1-3): 91-6.
38. Rabiee AR, Lean IJ, Stevenson MA, Socha MT. Effects of feeding organic trace minerals on milk production and reproductive performance in lactating dairy cows: A meta-analysis. *J Dairy Sci* 2010; 93: 4239-51.
39. Ran L, Wu X, Shen X, Zhang K, Ren F, Huang K. Effects of selenium form on blood and milk selenium concentrations, milk component and milk fatty acid composition in dairy cows. *J Sci Food Agric* 2010; 90(13): 2214-19.
40. Smith KL, Hogan JS, Weiss WP. Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. *J Anim Sci* 1997; 75:1659-65.
41. Sordillo LM, Shafer-Weaver K, DeRosa D. Immunobiology of the mammary gland. *J Dairy Sci* 1997; 80: 1851-65.
42. Tamasi G, Bellini M, Lorenzini S, Chindamo D, Marcolongo R, Baroni F, Riccobono F, Netti R, Cini R. Case Study for Selected Heavy Elements in Blood and Plasma from Six Female Patients with Systemic Sclerosis (Scleroderma,SSc).The Concentrations of Mercury, Lead, Antimony, Cobalt, Copper and Zinc. *The Open Analytical Chemistry Journal* 2008; 2: 55-61.
43. Tomlinson DJ, Mulling CH, Fakler TM. Invited review: formation of keratins in the bovine claw: roles of hormones, minerals and vitamins in functional claw integrity. *J Dairy Sci* 2004; 87: 797-809.

44. Tomlinson DJ, Socha MT, DeFrain JM. Role of trace minerals in the immune system. Proc. Penn. State Dairy Cattle Nutrition Workshop 2008: 39-52.
45. Van Ryn M. Relationship of copper, zinc, and selenium status with udder health and mastitis incidence in the poly holstein herd. College of Agriculture, Food and Environmental Science, California Polytechnic State University, San Luis Obispo, USA, 2009
46. Van Saun R.J. Ration approach to selenium supplementation essential. Feedstuffs 1990; 15:15-21.
47. Weiss WP, Wyatt DJ. Effects of feeding diets based on silage from corn hybrids that differed in concentration and in vitro digestibility of natural detergent fiber to dairy cows. J Dairy Sci 2002; 85: 3462-69.
48. Weiss WP, Hogan JS, Todhunter DA, Smith KL. Effect of vitamin E supplementation in diets with a low concentration of selenium on mammary gland health of dairy cows. J Dairy Sci 1997; 80: 1728-37.
49. Weiss WP. Relationship of mineral and vitamin supplementation with mastitis and milk quality. In: Proc. Annual Meeting, National Mastitis Council, Orlando, Florida, USA, 2002: 37-44.
50. Zhao X, Lacasse P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. J Anim Sci 2008; 86: 57-65.

ENGLISH

**THE INFLUENCE OF SELENIUM AND ZINC ADDITION IN FOOD ON CONCENTRATION OF THESE ELEMENTS IN BLOOD AND MILK, ON SOMATIC CELLS NUMBER AND HISTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF COWS UDDERS**

**Davidov Ivana, Cincović M. R., Radinović M., Erdeljan M., Belić Branislava, Toholj B., Stevančević M.**

The experiment included 30 cows of Holstein-Friesian breed, out of which 15 were receiving selenium and zinc in optimal doses before calving, while the others had never been supplemented with these micronutrients. There was analysed the concentration of selenium and zinc in blood and milk serum as well as the average number of somatic cells in corresponding lactation. After the cows exclusion from production, histological characteristics of cows udders were examined. The results of the investigation have shown that addition of selenium and zinc before calving has a positive effect on the values of these microelements in the blood and milk during the period of early lactation, that is, the concentration of these elements was significantly higher in the blood and milk of the cows that obtained selenium and zinc supplements. Also, in these cows there was significantly lower number of somatic cells during the following lactation period. In the parenchyma of the udder there was found less pronounced infiltration of leukocytes, notably thicker keratin layer of *ductus papillaris* and less expressed repairing processes that indicate a chronic inflammation of the udder in the samples after exclusion of the cows from production. There was a significant positive correlation between selenium in blood and milk, while there was not observed such a correlation for zinc. On the other hand, there was a significant negative correlation between the concentration of selenium in the blood and milk with the average number of somatic cells and the degree of infiltration of leukocytes, while its influence on the keratin layer of *ductus papillaris* was not shown. Zinc from blood and udder had a negative correlation with the number of somatic cells, had a positive correlation with the thickness of *ductus papillaris* keratin layer and had no influence on the level of leukocyte infiltration of udder parenchyma. Zinc demonstrates a positive influence on the formation of *ductus papillaris* keratin layer and protects the udder from pathogens penetration, while selenium stimulates the immunological response of the udder. Their positive impact can be

defined as additive, because although they have effect on two morphologically separate udder parts, adding both of them significantly decreases the number of somatic cells in milk.

Key words: selenium, zinc, dairy cows, mastitis, histology of the udder

РУССКИЙ

### ВЛИЯНИЕ КОРМОВЫХ ДОБАВОК С СОДЕРЖАНИЕМ ЦИНКА И СЕЛЕНА НА КОНЦЕНТРАЦИЮ ДАННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В КРОВИ И МОЛОКЕ, НА КОЛИЧЕСТВО СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК И ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЫМЕНИ У КОРОВ

Давидов Ивана, Цинцович М.Р., Радинович М., Ерделян М., Белич Бранислава, Тохоль Б., Стеванчевич М.

В эксперименте участвовало 30 коров голштино-фризской породы. 15 коров получали селен и цинк в оптимальной дозировке в период до отела, остальные 15 коров были отобраны из группы коров, никогда ранее на протяжении своей жизни не получавших указанные микроэлементы в виде добавок. Был проведен анализ концентрации селена и цинка в сыворотке молока и крови, а также среднего количества соматических клеток в соответствующей лактации. После выбытия коров были исследованы гистологические характеристики вымени. Результаты исследований показали, что употребление селена и цинка у коров в период перед отелом положительно влияет на показатели данных микроэлементов в крови и молоке в период ранней лактации, то есть концентрация этих элементов значительно выше в молоке и крови коров, получавших добавки, содержащее селен и цинк. У коров, получавших с кормами указанные микроэлементы, отмечено значительно меньше среднее количество соматических клеток в период последующей лактации. Отмечена менее выраженная инфильтрация паренхимы вымени лейкоцитами, значительно более толстый кератиновый слой *ductus papillaris* и менее выраженные репарационные процессы, указывающие на хроническое воспаление вымени в препаратах, полученных после выбытия коров из производства. Существует значительная позитивная корреляция между содержанием селена в крови и молоке, при этом такая корреляция не отмечена между показателями содержания цинка. Существует значительная отрицательная корреляция между концентрацией селена в крови и молоке со средним количеством соматических клеток и степенью лейкоцитарной инфильтрации, при этом влияние на кератиновый слой *ductus papillaris* не отмечено. Цинк, содержащийся в крови и вымени, отрицательно коррелирует с количеством соматических клеток, при этом положительно коррелирует с толщиной кератинового слоя *ductus papillaris*, а влияние на степень инфильтрации паренхимы вымени лейкоцитами отсутствует. Цинк оказывает положительное влияние на формирование кератинового слоя *ductus papillaris* и защищает вымя от проникновения возбудителей, в то время как селен влияет на иммунную реакцию вымени. Их положительное действие можно было бы охарактеризовать как аддитивное, так как, несмотря на то, что они воздействуют на два морфологически разных участка вымени, добавление и первого, и второго элемента значительно сокращает количество соматических клеток в молоке коров.

Ключевые слова: селен, цинк, молочная корова, мастит, гистология вымени