LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

Inga Merkelytė

VYNUOGIŲ (*VITIS VINIFERA*) EKSTRAKTO POVEIKIS MĖSINIŲ KARVIŲ REPRODUKCIJAI *POSTPARTUM* PERIODU

Daktaro disertacija
Žemės ūkio mokslai,
gyvūnų mokslai (A 003)

Kaunas, 2026

Disertacija rengta 2021–2026 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademijos Gyvulininkystės instituto Gyvūnų veisimo ir reprodukcijos skyriuje.

Mokslinis vadovas

dr. Artūras Šiukščius (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, žemės ūkio mokslai, gyvūnų mokslai – A 003).

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Gyvūnų mokslų krypties taryboje:

Pirmininkė

prof. dr. Elena Bartkienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, žemės ūkio mokslai, gyvūnų mokslai – A 003).

Nariai:

prof. dr. Vilma Vilienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, žemės ūkio mokslai, gyvūnų mokslai – A 003);

dr. Saulius Bliznikas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, žemės ūkio mokslai, gyvūnų mokslai – A 003);

dr. Antanas Šarkinas (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija – T005);

prof. dr. Liga Paura (Latvijos gyvybės mokslų ir technologijų universitetas (Latvija), žemės ūkio mokslai, gyvūnų mokslai – A 003).

Disertacija bus ginama viešajame Gyvūnų mokslų krypties tarybos posėdyje 2026 m. gruodžio 10 d. 11 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Gyvulininkystės instituto Posėdžių salėje.
Disertacijos gynimo vietos adresas: R. Žebenkos g. 12, Baisogala, Radviliškio raj., LT-82317.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES

Inga Merkelytė

EFFECT OF GRAPE (*VITIS VINIFERA*) EXTRACT ON BEEF CATTLE REPRODUCTION DURING THE *POSTPARTUM* PERIOD

Doctoral Dissertation
Agricultural Sciences,
Animal Sciences (A 003)

Kaunas, 2026

Dissertation has been prepared at the Department of the Animal Breeding and Reproduction of the Institute of Animal Science of the Veterinary Academy of the Lithuanian University of Health Sciences over the period from 2021 to 2026.

Scientific Supervisor

Dr. Artūras Šiukščius (Lithuanian University of Health Sciences, Agricultural Sciences, Animal Sciences – A 003).

Dissertation is defended at the Animal Sciences Research Council of Lithuanian University of Health Sciences:

Chairperson

Prof. Dr. Elena Bartkienė (Lithuanian University of Health Sciences, Agricultural Sciences, Animal Sciences – A 003).

Members:

Prof. Dr. Vilma Vilienė (Lithuanian University of Health Sciences, Agricultural Sciences, Animal Sciences – A 003);

Dr. Saulius Bliznikas (Lithuanian University of Health Sciences, Animal Sciences – A 003);

Dr. Antanas Šarkinas (Kaunas University of Technology, Technological Sciences, Chemical Engineering – T005);

Prof. Dr. Liga Paura (Latvia University of Life Sciences and Technologies, Agricultural Sciences, Animal Sciences – A 003).

Dissertation will be defended in an open session of the Animal Sciences Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences at 11 a.m. on the 10th of December, 2026 in the Conference Hall of the Institute of Animal Science of the Lithuanian University of Health Sciences.
Address: R. Žebenkos Str. 12, Baisogala, Radviliškio distr. LT–82317, Lithuania.

TURINYS

SANTRUMPOS 7
ĮVADAS 9
1. LITERATŪROS APŽVALGA 13
1.1. Mėsinių galvijų reprodukcijos biologinė ir ekonominė reikšmė 13
1.2. Gimdos mikrobiota po apsiveršiavimo 15
1.3. Oksidacinis stresas ir jo reikšmė reprodukcijai 17
1.4. Vynuogių polifenolių antioksidacinis ir priešuždegiminis veikimas 20
1.5. Vynuogių (*Vitis vinifera*) biologiškai aktyvūs junginiai ir jų poveikis galvijams 22
1.6. Šiuolaikinės reprodukcijos stebėsenos technologijos mėsinėje galvijininkystėje 27
1.6.1. Rujos ciklo fiziologija 27
1.6.2. Moderniosios rujos nustatymo technologijos 29
1.6.3. Pedometrai ir akselerometrai 32
1.6.4. Infraraudonųjų spindulių termografija reprodukcijos stebėsenai 34
1.7. Inovatyvių technologijų taikymo apribojimai ir gyvūnų gerovė 36
2. DARBO METODIKA 39
2.1. Tyrimo objektas 41
2.2. Gimdos mikrobiotos tyrimai 42
2.2.1. Gimdos mėginių paėmimas 43
2.2.2. Bakterijų (16S rRNR) ir grybų (ITS2) amplikonų sekoskaita 43
2.3. Oksidacinio streso žymenų tyrimai 45
2.3.1. Glutationo peroksidazės (GPx) tyrimas 45
2.3.2. Superoksido dismutazės (SOD) tyrimas 46
2.3.3. Malondialdehido (MDA) tyrimas 46
2.4. Hormonų tyrimas 47
2.5. Termografinis tyrimas 48
2.6. Didžiojo prieskrandžio temperatūros stebėsena 50
2.7. Spermos mėginių tyrimai 50
2.8. Pirmosios rujos po apsiveršiavimo nustatymas 52
2.9. Veršingumo rodiklio įvertinimas 52
2.10. Statistinė duomenų analizė 52
3.TYRIMŲ REZULTATAI 55
3.1. Gimdos mikrobiotos tyrimo rezultatai 55
3.1.1. Mėsinių karvių gimdos mikrobiotos bakterinė sudėtis 55
3.1.1.1. Mėsinių karvių gimdos mikrobiotos bakterijų tipų struktūros analizė 58
3.1.2. Mėsinių karvių gimdos mikrobiotos grybinė sudėtis 64
3.1.2.1. Mėsinių karvių gimdos mikobiotos taksonominės sudėties analizė 67
3.2. Oksidacinio streso žymenų tyrimo rezultatai 72
3.2.1. GPx (glutationo peroksidazės) tyrimo rezultatai 72
3.2.2. Superoksido dismutazės (SOD) tyrimo rezultatai 72
3.2.3. Malondialdehido MDA tyrimo rezultatai 73

3.3. Laikotarpio iki pirmosios rujos analizė 74
3.4. Vynuogių ekstrakto papildo poveikis reprodukciniams rodikliams 75
3.5. Veršingumo rodiklio rezultatai 76
3.6. Koreliacinė analizė 76
4. REZULTATŲ APTARIMAS 78
IŠVADOS 89
REKOMENDACIJOS 91
SUMMARY 92
LITERATŪROS SĄRAŠAS 139
PUBLIKACIJŲ, KURIOSE BUVO PASKELBTI DISERTACIJOS TYRIMŲ REZULTATAI, SĄRAŠAS 151
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS NE DISERTACIJOS TEMATIKA 152
DALYVAVIMAS MOKSLINĖSE KONFERENCIJOSE 154
CURRICULUM VITAE 155
PADĖKA 157

SANTRUMPOS

BHBA – *β*–hidroksibutiratas
CAT – katalazė
COX–2 – ciklooksigenazė–2
DNR – dezoksiribonukleino rūgštis
ELISA – imunofermentinis tyrimas (angl. *Enzyme–Linked Immunosorbent Assay*)
FSH – folikulus stimuliuojantis hormonas
GAE – galio rūgšties ekvivalentas (angl. *gallic acid equivalent*)
GLM – bendrasis tiesinis modelis
GPx – glutationo peroksidazė
GR – glutationo reduktazė
HO–1 – hemo oksigenazė–1
ICAM–1 – tarpląstelinė adhezijos molekulė–1
IRT – infraraudonųjų spindulių termografija
ITS – vidinis transkribuojamasis skirtukas
Keap1 – Kelch tipo ECH asocijuotas baltymas 1
LH – liuteinizuojantis hormonas
LMM – mišrusis tiesinis modelis
LPS – lipopolisacharidas
MDA – malondialdehidas
NADPH – nikotinamidadenindinukleotido fosfatas
NF–κB – branduolio faktorius κB
Nrf2 – branduolio faktorius, susijęs su eritroidiniu 2 faktoriumi
PGR – polimerazės grandininė reakcija
PPAR–γ – peroksisomų proliferatorių aktyvinamas receptorius gama
RDF – reaktyviosios deguonies formos
RFID – radijo dažnio atpažinimo technologija
rmcorr – pakartotinių matavimų koreliacija
rRNR – ribosominė ribonukleorūgštis
SCR – aktyvumo indeksas
SOD – superoksido dismutazė

SPSS – statistinės analizės programinės įrangos paketas *IBM SPSS Statistics*

TBARS – tiobarbitūrinei rūgščiai reaktyvios medžiagos

TLR4 – Toll tipo receptorius 4

TNF–α – naviko nekrozės faktorius alfa

ĮVADAS

Mėsinių karvių reprodukcinis efektyvumas yra vienas svarbiausių veiksnių, lemiančių bandos produktyvumą, ekonominį tvarumą ir galvijininkystės ūkių konkurencingumą. Pagrindinis reprodukcijos valdymo tikslas – užtikrinti, kad kiekviena karvė kasmet atsivestų po vieną veršelį, nes nuo apsiveršiavimų intervalo tiesiogiai priklauso veršelių kiekis, tenkantis vienai karvei per gyvenimą, taip pat gyvulių produktyvus naudojimas bei ūkio ekonominiai rezultatai [1]. Siekiant optimalaus reprodukcinio efektyvumo, po apsiveršiavimo karvių lytinis ciklas turi atsinaujinti laiku, kad jos būtų sėkmingai apvaisintos per numatytą veisimo laikotarpį. *Postpartum* periodas yra vienas sudėtingiausių fiziologinių etapų galvijo gyvenime, kurio metu vyksta gimdos involiucija, endometriumo regeneracija, kiaušidžių ciklinės veiklos atsinaujinimas, hormonų pusiausvyros atkūrimas ir medžiagų apykaitos pokyčiai. Bet kuris šių procesų sutrikimas gali pailginti laikotarpį iki pirmosios rujos, sumažinti apsivaisinimo tikimybę ir neigiamai paveikti visos bandos reprodukcinius rodiklius [2, 3].

Pastaraisiais metais požiūris į reprodukcinės sistemos atsistatymą *postpartum* periodu iš esmės pasikeitė. Ilgą laiką buvo manoma, kad sveika galvijų gimda yra sterili, tačiau, pradėjus taikyti nuo mikroorganizmų kultivavimo nepriklausomus molekulinius metodus, ypač 16S rRNR geno sekoskaitą, nustatyta, kad sveikos karvės gimdoje gali būti aptinkamos mažos biomasės mikroorganizmų bendrijos, kurių sudėtis ir įvairovė siejama su reprodukcinės sistemos fiziologine būkle [4–6]. Çömlekcioğlu ir kt. apžvalgoje mikrobiotos įvairovė įvardijama kaip svarbus gimdos sveikatos rodiklis, nes jos sumažėjimas siejamas su metritu ir klinikiniu endometritu [5]. Metritu sergančių karvių gimdos mikrobiotai būdingas didesnis *Fusobacteria* ir *Bacteroidetes* tipų santykinis gausumas, o genčių lygmeniu su šia liga siejamos *Bacteroides*, *Fusobacterium* ir *Porphyromonas.* Klinikinio endometrito atveju nustatytas padidėjęs *Fusobacterium, Bacteroides* ir *Trueperella* santykinis gausumas [5]. Autoriai taip pat pabrėžia, kad dėl didelio individualaus kintamumo ir skirtingų tyrimuose taikomų metodikų iki šiol nėra nustatyta vieninga sveikos galvijų gimdos mikrobiotos sudėtis [5].

Vis daugiau dėmesio skiriama ne tik bakterinei, bet ir grybinei gimdos mikrobiotai. Nors grybinės bendrijos ištirtos gerokai mažiau, manoma, kad jos taip pat gali dalyvauti reguliuojant vietinį imuninį atsaką ir gimdos homeostazę [7–10]. Naujausiose publikacijose pabrėžiama, kad reprodukcinės sistemos atsistatymą lemia ne pavieniai mikroorganizmai, bet visos mikrobinės bendrijos sąveika su šeimininko imunine sistema. Todėl šiuolaikiniai tyrimai vis dažniau orientuojami ne į atskirų patogenų identifikavimą, bet į mikro-

biotos pusiausvyros, uždegiminių procesų ir gimdos homeostazės atkūrimo mechanizmų analizę [6, 11–13].

Kitas svarbus reprodukcinių funkcijų atsistatymo veiksnys yra oksidacinis stresas. Fiziologinėmis sąlygomis reaktyviosios deguonies formos dalyvauja steroidogenezėje, folikulų augime, ovuliacijoje ir kitų ląstelinių signalinių procesų reguliavime, tačiau jų perteklius pažeidžia lipidus, baltymus ir nukleorūgštis, aktyvina uždegiminius procesus bei sutrikdo reprodukcinių audinių funkciją. Po apsiveršiavimo dėl padidėjusio energijos poreikio, intensyvaus lipidų metabolizmo ir imuninės sistemos aktyvacijos oksidacinio streso rizika reikšmingai padidėja, todėl sutrinka gimdos involiucija, folikulų vystymasis ir lytinio ciklo atsistatymas. Dėl šios priežasties oksidacinio streso žymenys, tokie kaip superoksido dismutazė (SOD), glutationo peroksidazė (GPx) ir malondialdehidas (MDA), laikomi svarbiais reprodukcinės sistemos funkcinės būklės rodikliais [3, 14–16].

Pastaraisiais metais vis daugiau tyrimų skiriama ir natūralių augalinės kilmės antioksidantų panaudojimui gyvulininkystėje. Vieni perspektyviausių bioaktyviųjų junginių yra vynuogių (*Vitis vinifera*) polifenoliai, pasižymintys antioksidaciniu, priešuždegiminiu ir antimikrobiniu poveikiu. Nustatyta, kad jie gali aktyvinti Nrf2–Keap1 (angl. *nuclear factor erythroid 2–related factor 2–Kelch–like ECH–associated protein 1*) signalinį kelią, skatinti endogeninių antioksidacinių fermentų sintezę, slopinti branduolio faktoriaus kappa B (NF–κB) aktyvumą ir mažinti uždegiminių citokinų ekspresiją, todėl gali prisidėti prie organizmo apsaugos nuo oksidacinio pažeidimo [14, 16–18]. Eder ir kt. apžvalgoje pabrėžiama, kad vynuogių kilmės produktai įvairių rūšių gyvūnams gali mažinti oksidacinį stresą ir uždegiminius procesus, tačiau jų poveikio galvijų reprodukcijai tyrimų duomenys yra riboti, todėl nėra vieningos nuomonės dėl jų sąsajų su vaisingumo rodikliais [15]. Dėl didelės biologiškai aktyvių polifenolių koncentracijos sausasis vynuogių ekstraktas gali būti perspektyvus natūralus pašarų papildas, galintis prisidėti prie antioksidacinės apsaugos ir uždegiminių procesų reguliavimo. Tačiau jo poveikis mėsinių karvių reprodukcinės sistemos atsistatymui *postpartum* periodu ir galimos sąsajos su gimdos mikrobiotos pokyčiais iki šiol ištirtos nepakankamai.

Ne mažiau svarbi šiuolaikinių reprodukcijos tyrimų kryptis yra tiksliosios gyvulininkystės technologijų taikymas. Judesio jutikliai, infraraudonųjų spindulių termografija, didžiojo prieskrandžio temperatūros stebėsena ir kitos automatizuotos sistemos leidžia nuolat registruoti gyvulių fiziologinius bei elgsenos pokyčius, tiksliau nustatyti rują ir anksti identifikuoti reprodukcinės sistemos sutrikimus [19–23]. Integruojant šias technologijas su molekuliniais mikrobiotos tyrimais ir oksidacinio streso žymenų analize atsiveria galimybės išsamiau suprasti reprodukcinės sistemos atsistatymo mechanizmus ir kurti individualizuotas reprodukcijos valdymo strategijas.

Atsižvelgiant į naujausius duomenis apie gimdos mikrobiotos reikšmę reprodukcinei sveikatai, augantį susidomėjimą natūralių polifenolių panaudojimu gyvulininkystėje ir tiksliosios gyvulininkystės technologijų plėtrą, vis dar trūksta tyrimų, kuriuose būtų kompleksiškai vertinamas sausojo vynuogių (*Vitis vinifera*) ekstrakto poveikis mėsinių karvių reprodukcinės sistemos atsistatymui postpartum periodu. Ypač mažai duomenų apie šio ekstrakto sąsajas su gimdos mikrobiotos pokyčiais, oksidacinio streso rodikliais ir reprodukciniais procesais, šiuos pokyčius kartu vertinant tiksliosios gyvulininkystės technologijomis. Todėl šiame darbe sausojo vynuogių ekstrakto poveikis mėsinių karvių reprodukcinei sistemai *postpartum* periodu buvo vertinamas kompleksiškai, analizuojant gimdos mikrobiotos pokyčius, oksidacinio streso žymenis, reprodukcinius rodiklius bei šiuolaikinių stebėsenos technologijų registruojamus fiziologinius parametrus.

Darbo tikslas

Įvertinti sausojo vynuogių (*Vitis vinifera*) ekstrakto, pasižyminčio antioksidacinėmis savybėmis, poveikį mėsinių galvijų reprodukcinei būklei *postpartum*, taikant šiuolaikines tiksliosios gyvulininkystės technologijas bei vertinant gimdos mikrobiotos pokyčius, reprodukcinius rodiklius, ir oksidacinio streso žymenis.

Darbo uždaviniai

1. Išanalizuoti sausojo vynuogių (*Vitis vinifera*) ekstrakto įtaką gimdos bakterinės ir grybinės mikrobiotos sudėties dinamikai *postpartum* periodu.
2. Įvertinti sausojo vynuogių (*Vitis vinifera*) ekstrakto poveikį oksidacinio streso žymenims (glutationo peroksidazei (GPx), superoksido dismutazei (SOD) ir malondialdehidui (MDA)) periodu po apsiveršiavimo.
3. Išanalizuoti sausojo vynuogių (*Vitis vinifera*) ekstrakto poveikį mėsinių galvijų reprodukciniams rodikliams *postpartum* periodu, taikant šiuolaikines tiksliosios gyvulininkystės technologijas.

Darbo naujumas ir praktinė reikšmė

Pastaraisiais metais vis daugiau dėmesio skiriama augalinės kilmės bioaktyviųjų junginių taikymui galvijų reprodukcijai gerinti, tačiau jų poveikio biologiniai mechanizmai *postpartum* periodu vis dar nėra pakankamai ištirti. Iki šiol dauguma tyrimų buvo orientuoti į reprodukcinių rodiklių vertinimą, o duomenų apie galimą polifenolių poveikį gimdos mikrobiotai, oksidaciniam stresui ir šių veiksnių sąveikai yra nedaug.

Šiame darbe kompleksiškai įvertintas sausojo vynuogių (*Vitis vinifera*) ekstrakto poveikis mėsinių galvijų reprodukcinei būklei *postpartum* periodu.

Pirmą kartą viename tyrime buvo įvertinti reprodukciniai rodikliai, gimdos bakterinės ir grybinės mikrobiotos pokyčiai bei oksidacinio streso žymenys (SOD, GPx ir MDA), kartu taikant šiuolaikines tiksliosios gyvulininkystės technologijas reprodukcinių procesų stebėsenai. Toks kompleksinis tyrimo modelis leido išsamiau įvertinti galimą sausojo vynuogių ekstrakto poveikį reprodukcinės sistemos atsistatymui *postpartum* periodu.

Darbo rezultatai papildo mokslines žinias apie polifenolių panaudojimo galimybes mėsinių galvijų reprodukcijos valdyme bei suteikia naujų duomenų apie galimas jų sąsajas su gimdos mikrobiotos sudėtimi ir oksidacinio streso procesais. Praktiniu požiūriu tyrimo rezultatai gali būti reikšmingi tobulinant mėsinių karvių reprodukcinės būklės stebėseną postpartum periodu. Didžiojo prieskrandžio temperatūros ir aktyvumo stebėsena gali papildyti rujos nustatymą ir padėti tiksliau identifikuoti reprodukcinės būklės pokyčius, o gauti duomenys apie sausąjį vynuogių ekstraktą suteikia pagrindą toliau vertinti jo panaudojimo galimybes mėsinių galvijų reprodukcijos valdyme.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Mėsinių galvijų reprodukcijos biologinė ir ekonominė reikšmė

Šiuolaikinės mėsinių galvijų reprodukcijos valdymo strategijos susiduria su vis didesniais iššūkiais dėl didėjančios pasaulinės jautienos paklausos. Gyventojų skaičiaus augimas, kylantis ekonomikos lygis ir besikeičiantys mitybos įpročiai per pastaruosius du dešimtmečius reikšmingai prisidėjo prie beveik 58 proc. padidėjusio pasaulinio mėsos suvartojimo [24]. Ši tendencija pabrėžia būtinybę tobulinti reprodukcijos valdymo metodus, siekiant padidinti produktyvumą ir sumažinti darbo sąnaudas. Tačiau mėsinių galvijų auginimo efektyvumas išlieka vienas mažiausių, palyginti su kitomis gyvulių rūšimis, todėl reikia novatoriškų ir tvarių technologinių sprendimų, skirtų reprodukciniams rodikliams optimizuoti [25–27].

Pagrindinis reprodukcijos valdymo tikslas yra užtikrinti, kad kiekviena karvė kasmet atsivestų po vieną veršelį, nes tai yra viena svarbiausių sąlygų bandos produktyvumui ir ekonominiam gyvybingumui išlaikyti [25]. Siekiant šio tikslo būtina užtikrinti, kad karvės būtų sėkmingai apvaisintos per pirmąsias 65–85 dienas po apsiveršiavimo. Nepavykus jų apvaisinti per šį laikotarpį, ilgėja intervalas tarp apsiveršiavimų, mažėja per gyvenimą atvedamų veršelių skaičius, didėja gyvulių išlaikymo sąnaudos ir blogėja ūkio ekonominiai rodikliai [25, 26, 28].

Vienas svarbiausių mėsinių karvių reprodukcijos valdymo etapų yra reprodukcinės sistemos atsistatymas *postpartum* periodu. Šiuo laikotarpiu vyksta gimdos involiucija, kiaušidžių ciklinės veiklos atsinaujinimas ir hormoninės reguliacijos pokyčiai, o šių procesų eigai įtakos gali turėti gyvulio metabolinė bei oksidacinė būklė ir gimdos mikrobiotos sudėtis [2, 6, 28, 29]. Sutrikus šių procesų eigai gali pailgėti laikotarpis iki pirmosios ovuliacijos ir rujos, sumažėti apsivaisinimo tikimybė bei ilgėti intervalas tarp apsiveršiavimų. Be to, pirmasis lytinis ciklas *postpartum* periodu ne visada pasireiškia aiškiais elgsenos požymiais – tyli ruja nustatoma maždaug 50–80 proc. karvių [30–32], todėl jos nustatymas praktinėmis ūkio sąlygomis išlieka svarbiu reprodukcijos valdymo iššūkiu.

Vienas iš pagrindinių reprodukcinės sėkmės iššūkių yra tyli ruja – būklė, kai ovuliacija vyksta be aiškiai išreikštų elgesio požymių. Šis reiškinys ypač dažnai pasireiškia pirmojo rujos ciklo po veršiavimosi metu, nustatomas maždaug 50–80 proc. karvių ir apsunkina optimalaus sėklinimo laiko parinkimą [30–32]. Reprodukcinės funkcijos atsistatymą po veršiavimosi gali sutrikdyti uždelsta gimdos involiucija, gimdos infekcijos, veršiavimosi komplikacijos ir padidėjęs oksidacinis stresas [3, 28]. Dėl šių veiksnių pailgėja laikotarpis iki lytinio ciklo atsinaujinimo, sutrinka folikulų vystymasis bei ovuliacija,

mažėja apsivaisinimo tikimybė ir blogėja reprodukciniai rodikliai [2, 6, 28, 29]. Todėl vis daugiau dėmesio skiriama priemonėms, galinčioms paspartinti reprodukcinės sistemos atsistatymą po veršiavimosi, sumažinti oksidacinį stresą ir pagerinti karvių vaisingumą.

Skirtingai nei pieninių karvių, mėsinių karvių reprodukcinės funkcijos atsikūrimą reikšmingai veikia veršelio žindymas ir karvės–veršelio ryšys, todėl nerujojimo laikotarpis po veršiavimosi paprastai būna ilgesnis [28, 33]. Reprodukcinės funkcijos atsinaujinimas priklauso nuo gimdos involiucijos ir pagumburio–hipofizės–kiaušidžių ašies veiklos normalizavimosi [3, 28].

Nesant apsiveršiavimo ir pogimdyminių komplikacijų, gimdos involiucija 77,5 proc. karvėms paprastai baigiasi tarp 10 ir 30 dienų [34]. Tačiau vien gimdos anatominių pokyčių nepakanka reprodukcinei funkcijai atsinaujinti. Ovuliacijos ir rujos atsinaujinimas priklauso nuo pagumburio, hipofizės ir kiaušidžių veiklos normalizavimosi [2, 35]. Viena svarbiausių sąlygų reprodukciniam ciklui atsinaujinti yra pakankamas gonadotropiną atpalaiduojančio hormono (GnRH) ir liuteinizuojančio hormono (LH) išsiskyrimo dažnis. Nustatyta, kad normaliam dominuojančio folikulo brendimui ir ovuliacijai būtina, jog LH būtų išskiriamas maždaug 4–5 impulsais per 10 valandų laikotarpį [36]. Tyrimai parodė, kad daugumos žindančių mėsinių karvių hipofizė jau apie 30–ąją parą po apsiveršiavimo geba sintetinti pakankamą liuteinizuojančio hormono (LH) kiekį, o kiaušidės išlieka jautrios šio hormono poveikiui [37]. Vis dėlto pirmoji ovuliacija dažnai vėluoja, nes dėl nepakankamo gonadotropiną atpalaiduojančio hormono (GnRH) ir LH impulsų dažnio didelė dalis susintetinto LH lieka sukaupta priekinėje hipofizės skiltyje ir nėra išskiriama į kraujotaką [38]. Dėl to, nors kiaušidėse jau vyksta aktyvus folikulų augimas, ovuliacija neįvyksta arba įvyksta gerokai vėliau. Pirmosios ovuliacijos metu susiformuoja funkciškai aktyvus geltonkūnis, tačiau gimdos involiucijos laikotarpiu tebėra intensyvi prostaglandinų sintezė ir metabolizmas. Dėl padidėjusios prostaglandinų sekrecijos geltonkūnis regresuoja anksčiau, todėl pirmasis lytinis ciklas postpartum periodu dažnai būna trumpesnis nei įprasta [39].

Kitas svarbus veiksnys, lemiantis lytinio ciklo atsinaujinimą mėsinėms karvėms, yra veršelio žindymas ir karvės–veršelio ryšys. Nuolatinis veršelio buvimas kartu su motina slopina gonadotropiną atpalaiduojančio hormono (GnRH) ir liuteinizuojančio hormono (LH) sekreciją, todėl sulėtėja dominuojančio folikulo brendimas ir užsitęsia pirmoji ovuliacija [40, 41]. Whisnant ir kt. nustatė, kad trumpalaikis (48–72 val.) veršelio atskyrimas nuo karvės padidina LH pulsų dažnį, sumažina žindymo slopinamąjį poveikį pagumburio–hipofizės–kiaušidžių ašiai ir paspartina pirmosios ovuliacijos bei lytinio ciklo atsinaujinimą po veršiavimosi [40]. Be to, nustatyta, kad atskyrus veršelį maždaug nuo 30–osios dienos po apsiveršiavimo, LH pulsų dažnis padidėja

jau per 2–5 dienas, o apie 85 proc. karvių pirmasis dominuojantis folikulas ovuliuoja [40, 42]. Siekiant maksimalaus efekto, veršeliai turi būti visiškai atskirti nuo motinų, neleidžiant jokio tiesioginio fizinio kontakto tarp jų [42]. K. Stagg ir kt. nustatė, kad iki 80–osios dienos po apsiveršiavimo ovuliacija buvo įvykusi 43 proc. karvių, kurių veršeliai buvo nuolat kartu su motina, 65 proc. karvių, kurių veršeliai buvo žindomi vieną kartą per dieną ir laikomi gretimuose garduose, bei 90 proc. karvių, kurių veršeliai taip pat buvo žindomi vieną kartą per dieną, tačiau tarp žindymų buvo visiškai atskirti nuo motinų. Įdomu tai, kad apie 15 proc. karvių į veršelio atskyrimą nereagavo – joms nebuvo nustatyta liuteinizuojančio hormono (LH) ir estradiolio koncentracijos padidėjimo. Šie rezultatai rodo, kad žindymo sukeltas GnRH ir LH sekrecijos slopinimas yra vienas pagrindinių užsitęsusią rują lemiančių mechanizmų. Todėl net trumpalaikis karvės ir veršelio kontakto nutraukimas gali reikšmingai paspartinti kiaušidžių ciklinės veiklos atsikūrimą ir sutrumpinti laikotarpį iki pirmosios ovuliacijos.

Reprodukcinės funkcijos atsikūrimą taip pat reikšmingai veikia gyvulio mityba [43]. Nepakankamas energijos kiekis racione mažina LH sekrecijos dažnį, todėl ilgėja laikotarpis iki pirmosios rujos *postpartum* periodu [44]. Šis poveikis ypač ryškus pirmaveršėms mėsinėms karvėms, kurios, be laktacijos, dar turi patenkinti savo organizmo augimo poreikius. Dėl to jų reprodukcinės funkcijos atsinaujinimas paprastai trunka ilgiau negu vyresnių karvių. Nustatyta, kad pirmaveršių laikotarpis iki lytinio ciklo atsinaujinimo vidutiniškai siekia 86 ± 0,7 paros, o vyresnių karvių – apie 68 ± 0,3 paros [45].

Nors reprodukcinės funkcijos atsikūrimą *postpartum* periodu lemia daugybė tarpusavyje susijusių veiksnių, pastaraisiais metais vis daugiau dėmesio skiriama gimdos mikrobiotai, kurios sudėtis ir pusiausvyra laikomos svarbiais gimdos atsistatymo bei tolesnio vaisingumo veiksniais.

1.2. Gimdos mikrobiota po apsiveršiavimo

Mikrobiota apibrėžiama kaip tam tikroje šeimininko organizmo ekologinėje nišoje aptinkamų mikroorganizmų – bakterijų, grybų, virusų ir pirmuonių – visuma [4]. Ilgą laiką buvo manoma, kad galvijų reprodukcinis traktas, ypač gimda, fiziologinėmis sąlygomis yra sterili aplinka [4, 5]. Tačiau, pradėjus taikyti nuo mikroorganizmų kultivavimo nepriklausomus molekulinius metodus, mikroorganizmų genetinė medžiaga buvo nustatyta ir kliniškai sveikų karvių gimdoje [7, 8, 46]. Vis dėlto dabartiniai duomenys apie sveikos gimdos mikrobiotą nėra vienareikšmiai – skirtinguose tyrimuose nustatoma nevienoda jos sudėtis ir gausumas, o rezultatams įtakos gali turėti mėginių paėmimo, analizės metodai bei maža mikrobinė biomasė. Todėl iki šiol nėra aiškiai apibrėžta sveikai galvijų gimdai būdinga mikrobiotos sudėtis.

Gimdos mikrobiotos sudėtį lemia daugybė tarpusavyje susijusių veiksnių. Nustatyta, kad mikrobiotos įvairovė ir mikroorganizmų santykinis gausumas gali skirtis priklausomai nuo lytinio ciklo fazės, veršingumo tarpsnio, postpartum periodo, gyvulio amžiaus, veislės ir genetinių ypatumų, taip pat mitybos bei laikymo sąlygų [5]. Murga Valderrama ir kt., tirdami sveikų karvių gimdos mikrobiotą, nustatė keturis pagrindinius bakterijų tipus – *Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes* ir *Proteobacteria*, kurių santykinis gausumas skyrėsi tarp gimdos kūno ir rago gleivinės [47]. Skirtinguose tyrimuose nustatomi gimdos mikrobiotos sudėties skirtumai gali būti susiję ne tik su biologiniais ypatumais, bet ir su taikomais mėginių paėmimo bei sekoskaitos metodais [47].

Didžiausias dėmesys moksliniuose tyrimuose skiriamas laikotarpiui po apsiveršiavimo, nes tuo metu gimda tampa ypač jautri mikroorganizmų kolonizacijai [6]. Gimdos mikrobiotos sudėtis kinta priklausomai nuo fiziologinės gyvulio būklės. Veršingumo metu gimdos kaklelio gleivių kamštis sudaro efektyvų apsauginį barjerą, ribojantį mikroorganizmų patekimą iš makšties į gimdos ertmę. Po apsiveršiavimo šis apsauginis mechanizmas išnyksta, todėl involiucijos laikotarpiu gimda tampa itin jautri bakterinei kolonizacijai. Jei šeimininko imuninė sistema nesugeba efektyviai kontroliuoti bakterijų dauginimosi, gali išsivystyti uždegiminiai procesai, lemiantys reprodukcinius sutrikimus. Dažniausiai su gimdos ligomis siejami patogenai yra *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes, Fusobacterium necrophorum, Bacteroides* spp. ir *Prevotella* spp. [48]. Šie mikroorganizmai laikomi pagrindiniais metrito ir endometrito sukėlėjais, galinčiais sukelti tiek subklinikines, tiek kliniškai pasireiškiančias infekcijas, dėl kurių sulėtėja gimdos involiucija, pailgėja laikotarpis iki pirmosios ovuliacijos ir blogėja apsivaisinimo rodikliai [9].

Pastaraisiais metais vis daugiau dėmesio skiriama ne tik bakterijoms, bet ir reprodukcinio trakto grybų bendrijoms. Nors bakterinės mikrobiotos sudėtis yra gana plačiai ištirta, duomenų apie grybinę mikrobiotą vis dar nepakanka. Vis dėlto naujausi tyrimai rodo, kad grybiniai mikroorganizmai gali atlikti svarbų vaidmenį reprodukcinės sistemos patologijoje ir prisidėti prie galvijų vaisingumo sumažėjimo [10]. Dažniausiai reprodukcinės sistemos sutrikimai siejami su *Aspergillus* ir *Candida* genties grybais, kurie gali kolonizuoti reprodukcinį traktą tiesiogiai arba patekti į organizmą su mikotoksinais užterštais pašarais. Grybinės infekcijos dažniausiai nustatomos esant predisponuojantiems veiksniams, tokiems kaip ilgalaikis intrauterininis gydymas antibiotikais, lėtinis endometritas, audinių nekrozė, imunosupresija ar anatominius pakitimus sukelianti pneumovagina [12]. Nors grybinės kilmės reprodukcinės ligos registruojamos rečiau nei bakterinės, jos gali būti reikšminga nevaisingumo ir abortų priežastis [4, 6].

Pastaraisiais metais vis daugiau tyrimų nagrinėja galimybę mikrobiotos sudėtį moduliuoti naudojant augalinės kilmės bioaktyviuosius junginius. Tarp tiriamų augalinės kilmės bioaktyviųjų medžiagų minimi eterinių aliejų komponentai, tokie kaip timolis, karvakrolis, eugenolis ir cinamaldehidas, taip pat įvairių vaistinių augalų fenoliniai junginiai, kurių antimikrobinės savybės vertinamos galvijų reprodukcinio trakto patogenų atžvilgiu [49]. Šių junginių tyrimai rodo augalinės kilmės medžiagų potencialą moduliuoti mikrobinę aplinką ir sudaro prielaidas ieškoti naujų priemonių reprodukcinio trakto mikrobiotos pusiausvyrai palaikyti. Ypač daug dėmesio skiriama polifenoliams, kurių gausu vynuogių (*Vitis vinifera*) produktuose. Tyrimai parodė, kad vynuogių kilmės polifenoliai gali keisti žarnyno mikrobiotos sudėtį [50], todėl keliama prielaida, jog panašus poveikis gali pasireikšti ir reprodukciniame trakte.

Be poveikio mikrobiotai, polifenoliai pasižymi stipriu antioksidaciniu aktyvumu. Didžiausią biologinį aktyvumą turi proantocianidinai, galintys neutralizuoti reaktyviąsias deguonies formas ir apsaugoti audinius nuo oksidacinių pažeidimų. Eksperimentiniai tyrimai su galvijų endometriumo ląstelėmis parodė, kad proantocianidinai reikšmingai sumažina β–hidroksibutirato sukeltą oksidacinį stresą [51]. Kadangi padidėjusi β–hidroksibutirato koncentracija siejama su ketoze ir reprodukciniais sutrikimais pereinamuoju laikotarpiu, šie rezultatai leidžia manyti, kad vynuogių polifenoliai gali prisidėti prie gimdos funkcijos atsistatymo ne tik moduliuodami mikrobiotą, bet ir mažindami oksidacinį endometriumo pažeidimą.

Nepaisant sparčiai augančio susidomėjimo galvijų reprodukcinio trakto mikrobiota, iki šiol nėra vieningos nuomonės apie sveikai gimdai būdingą mikroorganizmų sudėtį. Skirtingų autorių pateikiami rezultatai dažnai skiriasi dėl nevienodų mėginių paėmimo metodikų, sekoskaitos technologijų bei tiriamų populiacijų genetinių ir geografinių ypatumų [13, 52]. Be to, iki šiol trūksta tyrimų, kuriuose vienu metu būtų analizuojama tiek bakterinė, tiek grybinė gimdos mikrobiota, ypač mėsinių galvijų *postpartum* periodu. Šių žinių spragos riboja galimybes visapusiškai suprasti mikrobiotos reikšmę reprodukcinės sistemos atsistatymui ir pagrindžia tolesnių kompleksinių tyrimų būtinybę.

1.3. Oksidacinis stresas ir jo reikšmė reprodukcijai

Pastaraisiais metais vis daugiau dėmesio skiriama oksidacinio streso reikšmei reprodukcinei funkcijai. Nustatyta, kad fiziologinė reaktyviųjų deguonies formų (RDF) gamyba yra būtina normaliam folikulų vystymuisi, ovuliacijai ir geltonkūnio funkcijai palaikyti, tačiau jų perteklius gali sutrikdyti šiuos procesus ir neigiamai paveikti vaisingumą [2].

Oksidacinis stresas apibrėžiamas kaip būklė, kai organizme sutrinka pusiausvyra tarp reaktyviųjų oksidantų susidarymo ir antioksidacinės apsaugos sistemos pajėgumo juos neutralizuoti [53]. Esant padidėjusiai oksidantų gamybai arba susilpnėjus antioksidacinei apsaugai, reaktyviosios deguonies formos (RDF) pradeda kauptis ląstelėse ir audiniuose, sukeldamos oksidacinius pažeidimus. Pagrindiniai oksidacinio streso taikiniai yra polinesočiųjų riebalų rūgščių turintys membranų fosfolipidai, baltymai, nukleorūgštys bei kai kurie angliavandeniai, pavyzdžiui, hialurono rūgštis [53]. Dėl intensyvios šių biomolekulių oksidacijos sutrinka ląstelių funkcija, aktyvuojami apoptozės arba nekrozės procesai ir vystosi audinių pažeidimai. Reprodukcinėje sistemoje oksidacinės pusiausvyros sutrikimas gali neigiamai veikti folikulų vystymąsi, ovuliaciją, geltonkūnio funkciją ir endometriumo būklę [12].

Oksidantai apima tiek radikalines, tiek neradikalines deguonies, azoto ar chloro turinčias reaktyviąsias molekules [23]. Biologiškai svarbiausi laisvieji radikalai yra superoksido (O_2^-) ir hidroksilo (OH) radikalai. Superoksido radikalai daugiausia susidaro mitochondrijų elektronų pernašos grandinėje, kai molekulinis deguonis prisijungia vieną elektroną [24, 25]. Reikšmingas jų šaltinis taip pat yra aktyvuoti neutrofilai ir makrofagai, kurie uždegiminės reakcijos metu, veikiant fermentui NADPH oksidazei, intensyviai gamina reaktyviąsias deguonies formas [26, 27]. Superoksido radikalai dalyvauja tolesnėse oksidacijos reakcijose. Viena svarbiausių jų yra superoksido dismutazės (SOD) katalizuojama reakcija, kurios metu superoksido radikalai paverčiami vandenilio peroksidu (H_2O_2). Pastarasis, sąveikaudamas su laisvais geležies arba vario jonais, Fentono reakcijos metu virsta itin reaktyviais hidroksilo radikalais, pasižyminčiais stipriu citotoksiniu poveikiu [28–29].

Mėsinių karvių *postpartum* periodu oksidacinio streso intensyvumas gali būti susijęs su reprodukcinės sistemos atsistatymu ir vėlesniu vaisingumu. Hagita ir kt., tirdami Japonijos juodųjų veislės karves, nustatė, kad vėliau apsivaisinusių karvių gimdos skystyje *postpartum* periodu oksidacinio streso indeksas buvo didesnis nei anksčiau apsivaisinusių karvių [54]. Tyrime taip pat nustatytos sąsajos tarp gimdos skysčio antioksidacinio aktyvumo ir vėlesnių reprodukcinių rodiklių. Šie rezultatai rodo, kad oksidantų ir antioksidacinės apsaugos pusiausvyra gimdos aplinkoje *postpartum* periodu gali būti susijusi su tolesniu mėsinių karvių reprodukciniu efektyvumu.

Reaktyviųjų deguonies formų susidarymui įtakos turi ir mitybos veiksniai. Didesnis polinesočiųjų riebalų rūgščių kiekis pašare didina lipidų oksidacijos riziką, todėl kartu išauga antioksidantų poreikis, kuris apsaugo ląstelių membranas nuo peroksidacijos [31–34]. Kai didelis polinesočiųjų arba oksiduotų riebalų rūgščių kiekis derinamas su nepakankamu antioksidantų kiekiu, organizme padidėja lipidų peroksidacijos produktų koncentracija, laikoma vienu svarbiausių oksidacinio streso požymių [33, 35, 36]. Oksidantų gamybą taip

pat skatina įvairūs aplinkos teršalai, pesticidai, organiniai tirpikliai ir mikotoksinai, kurie aktyvina kepenų ksenobiotikų metabolizmo sistemą ir didina reaktyviųjų deguonies formų susidarymą [37, 38].

Ksenobiotikų metabolizmas vyksta endoplazminiame tinkle ir apima dvi pagrindines fazes. Pirmosios fazės metu citochromo P450 fermentų sistema oksiduoja svetimkūnius, į jų molekules įterpdama reaktyvias funkcines grupes. Antrojoje fazėje šios medžiagos konjuguojamos su gliukurono rūgštimi, sulfatais ar kitais poliniais junginiais, todėl tampa mažiau toksiškos ir pašalinamos su tulžimi arba šlapimu [39]. Tačiau kai kurių junginių metabolizmas citochromo P450 sistemoje kartu skatina superoksido radikalų ir kitų reaktyviųjų deguonies formų susidarymą, todėl didėja oksidacinio streso, citotoksiškumo ir genotoksiškumo rizika [40, 41].

Ilgą laiką manyta, kad reaktyviosios deguonies formos organizme atlieka tik žalingą vaidmenį. Tačiau pastarųjų metų tyrimai parodė, kad fiziologinės jų koncentracijos yra būtinos normaliam ląstelių funkcionavimui. Nedidelis reaktyviųjų deguonies formų kiekis dalyvauja tarpląstelinėje signalizacijoje ir reguliuoja redoksui jautrių baltymų aktyvumą, modifikuodamas jų cisteino liekanas [42]. Todėl organizme egzistuoja sudėtinga sistema, palaikanti fiziologinę oksidantų ir antioksidantų pusiausvyrą.

Padidėjus reaktyviųjų deguonies formų koncentracijai, aktyvuojami adaptaciniai apsauginiai mechanizmai, kurių tikslas – sumažinti oksidacinius pažeidimus ir išlaikyti ląstelių homeostazę. Vienas svarbiausių šios sistemos reguliatorių yra branduolio faktorius Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2–related factor 2*), kontroliuojantis antioksidacinių ir citoprotekcinių genų ekspresiją [43–47]. Fiziologinėmis sąlygomis Nrf2 yra susijungęs su baltymu Keap1, kuris slopina jo aktyvumą. Padidėjus reaktyviųjų deguonies formų kiekiui, Keap1 struktūra pakinta, todėl Nrf2 atsiskiria, migruoja į ląstelės branduolį ir aktyvina antioksidacinio atsako elementus turinčių genų transkripciją. Dėl to padidėja fermentinių antioksidantų – superoksido dismutazės (SOD), katalazės (CAT), glutationo peroksidazės (GPx) ir glutationo reduktazės (GR) – sintezė, taip pat suaktyvėja glutationo metabolizmas, metalus surišančių baltymų ir detoksikacijos fermentų ekspresija [45–47]. Šių baltymų veikla ne tik mažina oksidacinį stresą, bet ir palaiko ląstelių homeostazę, stiprina apsaugą nuo uždegimo bei gerina ksenobiotikų neutralizavimą [43].

Be fermentinių antioksidantų, svarbią apsauginę funkciją atlieka ir mažos molekulinės masės antioksidantai – askorbo rūgštis, tokoferoliai, tokotrienoliai, karotenoidai, šlapimo rūgštis, glutationas bei augalinės kilmės flavonoidai ir polifenoliai [48–50]. Šios medžiagos tiesiogiai neutralizuoja reaktyviąsias deguonies formas ir apsaugo ląstelių struktūras nuo oksidacinio pažeidimo.

Pastaraisiais metais vis daugiau dėmesio skiriama mitohormezės (*mitohormesis*) reiškiniui. Nustatyta, kad nedidelis reaktyviųjų deguonies formų kiekio padidėjimas mitochondrijose gali aktyvinti adaptacinius apsauginius mechanizmus, tarp jų ir Nrf2 signalinį kelią, taip didindamas ląstelių atsparumą stresui bei palaikydamas organizmo homeostazę [51–53]. Tačiau pernelyg didelės antioksidantų dozės gali slopinti šiuos fiziologinius signalinius mechanizmus ir sumažinti jų teikiamą apsauginį poveikį [54, 55].

1.4. Vynuogių polifenolių antioksidacinis ir priešuždegiminis veikimas

Vynuogėse (*Vitis vinifera*) esantys polifenoliai pasižymi stipriu antioksidaciniu ir priešuždegiminiu poveikiu, kuris patvirtintas tiek *in vitro*, tiek *in vivo* tyrimuose [14, 18, 55, 56]. Šių junginių biologinis aktyvumas daugiausia priklauso nuo jų cheminės struktūros. Aromatiniai žiedai su hidroksilo (–OH) grupėmis leidžia polifenoliams lengvai atiduoti elektronus, išlaikant molekulės stabilumą, todėl jie efektyviai neutralizuoja reaktyviąsias deguonies formas, įskaitant superoksido radikalus, ir apsaugo ląsteles nuo oksidacinio pažeidimo [57].

Papildomas polifenolių antioksidacinio poveikio mechanizmas siejamas su jų gebėjimu chelatuoti redoksiškai aktyvius metalų jonus, ypač – geležies ir vario, taip mažinant laisvųjų radikalų susidarymą. Šie metalai laisvoje būsenoje katalizuoja Fentono reakciją, kurios metu iš vandenilio peroksido susidaro itin reaktyvūs hidroksilo radikalai. Susijungdami su geležies ir vario jonais, polifenoliai sumažina hidroksilo radikalų susidarymą ir taip apsaugo audinius nuo oksidacinio pažeidimo [58].

Be tiesioginio laisvųjų radikalų neutralizavimo, polifenoliai aktyvina ir endogenines antioksidacinės apsaugos sistemas. Vienas svarbiausių mechanizmų yra branduolio faktoriaus Nrf2 aktyvinimas. Organizmas polifenolius atpažįsta kaip ksenobiotikus, todėl jų poveikis sukelia adaptacinį atsaką, apibūdinamą hormezės principu. Dėl to aktyvinami ne tik antioksidaciniai, bet ir detoksikacijos procesus reguliuojantys genai, koduojantys I ir II fazės ksenobiotikų metabolizmo fermentus. Šis atsakas padidina ląstelių atsparumą oksidaciniam stresui ir kitų potencialiai žalingų junginių poveikiui [57–60]. Vienas svarbiausių Nrf2 aktyvinamų citoprotekcinių baltymų yra hemo oksigenazė–1 (HO–1), kuri pasižymi stipriu priešuždegiminiu poveikiu ir prisideda prie audinių apsaugos nuo oksidacinio pažeidimo [15].

Tiesioginių duomenų apie polifenolių poveikį galvijų reprodukciniams audiniams pateikta nedaug, tačiau atlikti tyrimai su galvijų endometriumo ląstelėmis patvirtina jų antioksidacinį potencialą. Cheng ir kt. nustatė, kad proantocianidinai sumažino β–hidroksibutirato sukeltą oksidacinį pažeidimą galvijų endometriumo ląstelėse, padidino glutationo peroksidazės, katalazės

ir bendrą antioksidacinį aktyvumą bei sumažino malondialdehido koncentraciją. Šis poveikis buvo susijęs su Nrf2 signalinio kelio aktyvinimu ir padidėjusia HO–1, Mn–SOD bei kitų antioksidacinės apsaugos baltymų ekspresija [61]. Šie rezultatai rodo, kad proantocianidinai gali apsaugoti galvijų endometriumo ląsteles nuo metabolinio streso sukelto oksidacinio pažeidimo.

Priešuždegiminis polifenolių poveikis daugiausia siejamas su NF–κB signalinio kelio slopinimu. NF–κB yra vienas svarbiausių uždegiminio atsako reguliatorių, kontroliuojantis uždegiminių citokinų, adhezijos molekulių ir uždegiminių fermentų sintezę [62, 64, 65]. Įprastomis sąlygomis NF–κB citoplazmoje yra susijungęs su inhibitoriniu baltymu IκBα. Veikiant įvairiems dirgikliams, įskaitant reaktyviąsias deguonies formas, lipopolisacharidus (LPS) ar prouždegiminius citokinus, aktyvinamos IKKα ir IKKβ kinazės, kurios fosforilina IκBα. Dėl to inhibitorinis baltymas degraduoja, o aktyvus NF–κB patenka į branduolį ir inicijuoja uždegiminių genų transkripciją [59, 62, 64, 65].

Polifenoliai slopina šį procesą keliais mechanizmais. Jie mažina NF–κB ekspresiją, slopina jo aktyvaciją bei mažina IKKβ fermento aktyvumą, taip pat slopina Toll tipo receptorių (TLR4) signalinį kelią, kuris yra vienas svarbiausių uždegiminės reakcijos aktyvatorių [60]. Dėl šių procesų sumažėja uždegiminių citokinų, tokių kaip naviko nekrozės faktorius alfa (TNF–α), interleukinai IL–1 ir IL–6, chemokinų, ciklooksigenazės–2 (COX–2), indukuojamos azoto oksido sintazės (iNOS), adhezijos molekulių (ICAM–1, VCAM–1) bei matricos kimmetaloproteinazių ekspresija [66–68]. Be to, nustatyta, kad polifenoliai aktyvina peroksisomų proliferatorių aktyvinamą receptorių gama (PPAR–γ), kuris papildomai slopina NF–κB signalinį kelią ir stiprina priešuždegiminį atsaką [69].

Kadangi oksidacinis stresas yra vienas pagrindinių uždegiminio proceso iniciatorių, reaktyviųjų deguonies formų neutralizavimas savaime mažina uždegiminio atsako aktyvumą [15,70]. Taigi polifenoliai veikia kompleksiškai – ne tik tiesiogiai neutralizuoja laisvuosius radikalus, bet ir aktyvina endogenines antioksidacines sistemas, reguliuoja uždegimines signalines grandines bei palaiko ląstelių homeostazę.

Nrf2 aktyvinimas taip pat skatina autofagijos procesus – evoliuciškai išsivysčiusį mechanizmą, kurio metu lizosomose suskaidomi pažeisti baltymai ir organelės [58, 62]. Ypač svarbus yra pažeistų mitochondrijų pašalinimas, nes jų funkcijos sutrikimai didina reaktyviųjų deguonies formų gamybą ir gali inicijuoti ląstelių apoptozę [63]. Nustatyta, kad polifenoliai, įskaitant epigalokatechino galatą, aktyvindami autofagiją mažina oksidacinį stresą ir jo sukeltus uždegiminius procesus [64]. Be to, autofagijos metu susidariusios aminorūgštys, riebalų rūgštys ir nukleotidai gali būti panaudojami energijos gamybai bei ląstelių atsistatymo procesams [62, 64].

Vynuogių polifenolių antioksidacinis ir priešuždegiminis poveikis plačiai aprašytas įvairiuose eksperimentiniuose modeliuose. Tačiau tiesioginių tyrimų su galvijų reprodukciniais audiniais, ypač su mėsinėmis karvėmis *post-partum* periodu, vis dar nedaug. Didelė dalis duomenų apie šių junginių biologinio poveikio mechanizmus gauta atliekant tyrimus su kitų rūšių gyvūnais arba ląstelių kultūromis, todėl šių rezultatų pritaikymas mėsinių karvių reprodukcinei sistemai yra ribotas.

1.5. Vynuogių (*Vitis vinifera*) biologiškai aktyvūs junginiai ir jų poveikis galvijams

Europos Sąjungai 2006 m. uždraudus antibiotikų naudojimą augimui skatinti, moksliniai tyrimai vis daugiau dėmesio skiria alternatyvių natūralios kilmės medžiagų paieškai, galinčių palaikyti gyvūnų sveikatingumą ir produktyvumą [71]. Viena perspektyviausių tokių medžiagų grupių yra augalų sintetinami biologiškai aktyvūs junginiai. Augalai sintetina gausybę antrinių metabolitų, kuriems būdingos įvairios biologinės savybės, o daugelio jų teigiamas poveikis žmogaus ir gyvūnų organizmui patvirtintas eksperimentiniais tyrimais. Nustatyta, kad šie junginiai gali prisidėti prie oksidacinio streso mažinimo, uždegiminių procesų slopinimo, imuninės sistemos funkcijų palaikymo bei bendros organizmo homeostazės išsaugojimo tiek laboratoriniuose, tiek įvairių rūšių ūkiniams gyvūnams atliktuose tyrimuose [72–76].

Iš augalų antrinių metabolitų grupių didžiausias mokslininkų dėmesys skiriamas polifenoliams, kurie pasižymi stipriomis antioksidacinėmis ir priešuždegiminėmis savybėmis [14, 56, 57, 77–79]. Vynuogės (*Vitis vinifera*) yra gausus natūralių fenolinių junginių šaltinis, o šie junginiai aptinkami uogų odelėse, sėklose ir minkštime [18]. Vynuogės (*Vitis vinifera*) yra vieni plačiausiai pasaulyje auginamų vaisinių augalų. Kasmet pasaulyje užauginama daugiau kaip 78 mln. tonų vynuogių, iš kurių apie 47–57 proc. panaudojama vyno gamybai [80]. Vynuogės išsiskiria itin dideliu natūralių polifenolių kiekiu ir laikomos vienu svarbiausių šių bioaktyviųjų junginių šaltinių augaliniame maiste. Vynuogių perdirbimo metu susidaro nemažas kiekis šalutinių produktų, pirmiausia vynuogių išspaudų, kurios dėl jose išlikusio didelio bioaktyviųjų junginių kiekio gali būti naudojamos kaip vertingas pašarų priedas ūkinių gyvūnų mityboje [81–84]. Fenolinių junginių kiekis ir sudėtis skirtingose vynuogių dalyse nevienodi. Vynuogių išspaudų, odelių ir sėklų fenolinių junginių sudėties bei kiekio skirtumai pateikti 1.5.1 lentelėje.

1.5.1 lentelė. *Vynuogių išspaudų, odelių ir sėklų fenolinių junginių sudėtis ir kiekis (g/kg SM), adaptuota pagal Ospina–Romero ir kt. [85]*

Fenoliniai junginiai	Išspaudos	Odelės	Sėklos
Bendras fenolinių junginių kiekis	19,0–40,5	20,2–52,3	36,6–88,7
Bendras taninų kiekis	39,1–105,8	44,9–73,0	62,3–167,8
Fenolinės rūgštys	0,03–8,31	0,17–8,23	0,10–0,11
Katechinai	0,03	0–0,30	2,14–2,42
Epikatechinas	0–0,20	0–0,13	0,88–1,60
Epigalokatechinas	0–0,05	ND	0,05
Epigalokatechino galatas	0–0,007	ND	0,06–0,07
Epikatechino galatas	0,003	0,04	0,25–0,31
Procianidinas B1	0,11–0,60	0,18–0,60	0,14–0,17
Procianidinas B2	0,01–0,84	0,01–0,84	0,04–0,18
Antocianinai	11,47–29,82	11,47–29,82	ND
Bendras flavanolių kiekis	0,03–0,63	ND	0,02–0,05

Pastaba: SM – sausoji medžiaga; ND – nenustatyta.

Didžiausias bendras fenolinių junginių kiekis nustatomas vynuogių sėklose – 36,6–88,7 g/kg sausosios medžiagos, palyginti su 20,2–52,3 g/kg odelėse ir 19,0–40,5 g/kg išspaudose (1.5.1 lentelė). Sėklos taip pat išsiskiria didesniu bendru taninų, katechinų ir epikatechino kiekiu, o antocianinai būdingi vynuogių odelėms ir išspaudoms. Šie duomenys rodo, kad atskiros vynuogių dalys skiriasi ne tik bendru fenolinių junginių kiekiu, bet ir jų sudėtimi [86].

Tiriant įvairių veislių vynuoges nustatyta, kad bendras fenolinių junginių kiekis sėklose kito nuo 261,79 iki 381,22 mg GAE/g sausosios masės, o odelėse – nuo 21,59 iki 36,52 mg GAE/g sausosios masės, todėl sėklose jų buvo maždaug 8–12 kartų daugiau. Taip pat nustatyta labai stipri teigiama koreliacija tarp bendro fenolinių junginių kiekio ir antioksidacinio aktyvumo (DPPH: r = 0,926; ABTS: r = 0,987), patvirtinanti, kad fenoliniai junginiai yra pagrindiniai vynuogių antioksidacinio aktyvumo veiksniai [87]. Vynuogėse vyrauja flavonoidai – gausiausia polifenolių grupė, atliekanti svarbias apsaugines funkcijas augaluose, įskaitant antioksidacinį, antimikrobinį ir apsauginį nuo ultravioletinių spindulių poveikį [88–91].

Atsižvelgiant į heterociklinio žiedo struktūrą, flavonoidai skirstomi į šešias pagrindines grupes: flavan–3–olius, flavonolius, antocianinus, flavonus, izoflavonus ir flavanonus [92]. Didžiausią biologinę reikšmę turi tokie junginiai kaip katechinai, epikatechinai, epigalokatechinai, kvercetinas, miricetinas, cianidinas, naringeninas, genisteinas ir daidzeinas, kurių antioksidacinės, priešuždegiminės bei imunomoduliacinės savybės plačiai aprašytos mokslinėje literatūroje [58,76,93]. Vynuogėse aptinkami ir neflavonoidiniai polifenoliai, iš kurių pagrindinėms grupėms priskiriami stilbenai ir fenoli-

nės rūgštys [94]. Stilbenai augaluose veikia kaip fitoaleksinai – apsauginiai junginiai, sintetinami reaguojant į patogenų ar kitų aplinkos stresorių poveikį. Geriausiai ištirtas šios grupės junginys yra resveratrolis, kuris pasižymi stipriu antioksidaciniu, priešuždegiminiu ir citoprotekciniu poveikiu. Kiti svarbūs stilbenai yra transpiceidas ir transviniferinai. Fenolinėms rūgštims priskiriamos hidroksicinamono ir hidroksibenzenkarboksirūgštys, kurios taip pat dalyvauja augalo apsaugos mechanizmuose nuo bakterijų, grybų ir virusų [93]. Pagrindiniai vynuogių išspaudose aptinkami fenoliniai junginiai yra katechinai, proantocianidinai, flavonolių glikozidai, fenolinės rūgštys bei antocianinai [95–98].

Vynuogių ekstraktai – tai koncentruoti bioaktyviųjų junginių preparatai, gaunami ekstrahuojant vynuoges arba atskiras jų dalis – sėklas, odeles ar išspaudas. Ekstrakcijos metu iš augalinės žaliavos išskiriami fenoliniai junginiai, todėl ekstraktuose jų koncentracija paprastai yra didesnė nei pradinėje žaliavoje. Ekstraktų cheminė sudėtis priklauso nuo naudojamos vynuogių dalies, veislės ir ekstrakcijos metodo. Vynuogių sėklų ekstraktuose vyrauja flavan–3–oliai ir proantocianidinai, o odelių bei išspaudų ekstraktuose aptinkama daugiau antocianinų ir kitų flavonoidų. Dėl koncentruoto bioaktyviųjų junginių kiekio ekstraktai gali būti naudojami kaip standartizuoti augalinės kilmės pašarų priedai. Dėl didelės polifenolių koncentracijos vynuogių ekstraktai pastaraisiais metais sulaukė didelio mokslininkų dėmesio kaip natūralūs pašarų priedai gyvulininkystėje. Juose esantys bioaktyvūs junginiai gali prisidėti prie oksidacinio streso mažinimo, imuninės sistemos funkcijos palaikymo ir palankios reprodukcinei funkcijai fiziologinės būklės palaikymo [99–102]. Pastaraisiais metais atlikta nemažai tyrimų, kuriuose vertintas vynuogių kilmės produktų panaudojimas gyvūnų šėrime, siekiant sumažinti oksidacinio streso ir uždegiminių procesų neigiamą poveikį organizmui [103–105]. Manoma, kad didelė polifenolių koncentracija gali neutralizuoti reaktyviąsias deguonies formas, apsaugoti ląsteles nuo oksidacinių pažeidimų bei prisidėti prie fiziologinių funkcijų palaikymo įvairių rūšių ūkiniams gyvūnams [106–108]. Vis dėlto iki šiol paskelbti tyrimų rezultatai skiriasi, o duomenys apie vynuogių kilmės produktų poveikį antioksidacinei sistemai ir uždegiminiams procesams išlieka skirtingi, todėl šioje srityje reikalingi tolesni išsamūs tyrimai. Be to, nustatyta, kad jie gali moduliuoti gimdos bakterijų ir grybelių sudėtį bei skatinti palankią mikroorganizmų pusiausvyrą, taip netiesiogiai prisidėdami prie reprodukcinės sistemos funkcijos palaikymo [109].

Nors tam tikrų polifenolių randama ir pašariniuose augaluose, jų koncentracija natūraliose ganyklose dažniausiai yra nedidelė ir labai kintanti, todėl vien pašaru ne visada galima užtikrinti biologiškai aktyvų šių junginių kiekį [79]. Dėl šios priežasties vis dažniau tiriamos koncentruotų augalinių ekstraktų panaudojimo galimybės gyvulių mityboje.

Pereinamuoju laikotarpiu nuo vėlyvojo veršingumo iki ankstyvosios laktacijos kepenyse suintensyvėja uždegiminiai ir oksidaciniai procesai. Tai lemia bakterinės kilmės komponentai, uždegiminiai citokinai bei padidėjusi reaktyviųjų deguonies formų gamyba. Šiuos procesus dar labiau sustiprina dažniausiai po veršiavimosi pasitaikančios ligos – nuovalų užsilaikymas, distokija, endometritas, gimdos ar makšties iškritimas [110–112]. Dėl šių priežasčių kepenyse aktyvuojamas ūmios fazės atsakas, vystosi uždegiminiai procesai, oksidacinis stresas bei endoplazminio tinklo (ET) patologijos, kurios neigiamai veikia ne tik karvių sveikatingumą, bet ir produktyvumą [53, 113–117].

Pastaraisiais metais vis daugiau tyrimų nagrinėja, ar vynuogių kilmės produktai gali sumažinti šiuos nepageidaujamus procesus. Gessner ir kt. [70] tyrė vynuogių sėklų ir išspaudų miltų, sudarančių 1 proc. visaverčio pašaro mišinio, poveikį karvių organizmui pirmąją ir trečiąją savaitę po apsiveršiavimo. Nors antioksidacinio pajėgumo rodikliai, lipidų peroksidacijos produktų (TBARS) koncentracija ir daugelio uždegiminių genų raiška statistiškai reikšmingai nepakito, nustatyta mažesnė fibroblastų augimo faktoriaus 21 (FGF21) ekspresija. Kadangi FGF21 laikomas metabolinio streso biomarkeriu, autoriai padarė išvadą, kad vynuogių ekstraktas gali sumažinti metabolinį stresą ankstyvosios laktacijos metu [118, 119]. Kitame mokslininkų grupės tyrime buvo atlikta kepenų transkriptomo analizė praėjus vienai savaitei po apsiveršiavimo [120]. Nustatyta, kad karvių, gavusių vynuogių sėklų ir išspaudų ekstraktą, kepenyse sumažėjo genų, susijusių su endoplazminio tinklo stresu bei uždegiminiais procesais, raiška. Be to, sumažėjo ūmios fazės baltymų – serumo amiloido A ir haptoglobino – koncentracija kraujo plazmoje. Šie rezultatai leidžia manyti, kad vynuogių kilmės polifenoliai gali slopinti uždegiminį atsaką ir mažinti endoplazminio tinklo stresą pereinamuoju laikotarpiu. Panašius rezultatus pateikė Gorbert ir kt. [121], kurie pieninėms karvėms skyrė pašarą, papildytą sėmenų aliejumi, vitaminu E ir augaliniu polifenolių ekstraktu, kuriame buvo ir vynuogių komponentų. Tyrimo metu sumažėjo plazmos lipidų jautrumas oksidacijai bei malondialdehido (MDA) koncentracija. Vis dėlto autoriai pažymėjo, kad dėl mišrios ekstrakto sudėties nebuvo galima tiksliai įvertinti, kokią dalį stebėto poveikio lėmė būtent vynuogių polifenoliai.

Chedea ir kt. [122] analizavo 15 proc. vynuogių išspaudų įtraukimo į racioną poveikį pieninių karvių kraujo rodikliams bei pieno kokybei. Tyrimo metu nustatyta padidėjusi polifenolių koncentracija kraujo plazmoje, rodanti gerą šių bioaktyviųjų junginių pasisavinimą. Tačiau antioksidacinės sistemos aktyvumas ir uždegiminiai rodikliai šiame tyrime nebuvo vertinti, todėl jų poveikis organizmo oksidacinei būklei liko neįvertintas.

Signor ir kt. vertino vynuogių sėklų aliejaus poveikį Džersio veislės telyčioms *postpartum* laikotarpiu. Kasdien skiriant po 25 ml vynuogių sėklų

aliejaus nustatyta mažesnė TBARS koncentracija ir didesnis bendras antioksidacinis pajėgumas kraujo plazmoje, tačiau reikšmingo poveikio pašaro suvartojimui ir pieno produkcijai nenustatyta [123].

Huang ir kt. tyrė skirtingų dozių vynuogių sėklų ekstrakto poveikį pieninėms karvėms. Nors papildų naudojimas neturėjo reikšmingos įtakos pašaro suvartojimui, superoksido dismutazės (SOD) ir glutationo peroksidazės (GPx) aktyvumui, bendrajam antioksidaciniam pajėgumui ar MDA koncentracijai, mažiausia tiriama dozė (20 mg/kg kūno masės per parą) reikšmingai padidino pieno primilžį [124].

Urkmez ir Biricik tyrė skirtingų dozių vynuogių sėklų ekstrakto (25, 50 ir 100 mg/kg kūno masės per parą) poveikį trijų dienų amžiaus karščio stresą patyrusiems veršeliams. Nustatyta, kad didėjant ekstrakto dozei reikšmingai mažėjo malondialdehido (MDA) ir naviko nekrozės faktoriaus alfa (TNF–α) koncentracija kraujo plazmoje, o superoksido dismutazės (SOD) aktyvumas didėjo. Kiti antioksidacinės sistemos bei uždegimo rodikliai reikšmingų pokyčių neparodė. Autoriai padarė išvadą, kad vynuogių sėklų ekstraktas gali pagerinti antioksidacinę apsaugą ir sumažinti uždegiminį atsaką veršelių organizme [125].

Kitų autorių gauti rezultatai buvo kontraversiški. Iannaccone ir kt. keturių mėnesių amžiaus Fryzų veislės galvijams skirdami racioną, papildytą 10 proc. vynuogių išspaudų miltais, nustatė padidėjusią IL–1 ir NF–κB signalinių kelių genų raišką kraujo ląstelėse, kas gali rodyti imuninės sistemos aktyvaciją. Tačiau uždegiminių citokinų koncentracija šiame tyrime nebuvo vertinta, todėl šių pokyčių biologinė reikšmė išlieka neaiški. Tuo pačiu buvo nustatyta mažesnė MDA koncentracija mėsoje po septynių parų laikymo, rodanti sumažėjusią lipidų peroksidaciją ir geresnį mėsos oksidacinį stabilumą [127].

Priešingus rezultatus pateikė Li ir kt., kurie 16 mėnesių amžiaus Angus veislės buliams 141 dieną skyrė racioną, papildytą džiovintomis vynuogių išspaudomis (100 arba 200 g/kg visaverčio pašaro mišinio). Tyrimo metu nenustatyta reikšmingo poveikio nei reaktyviųjų deguonies formų, nei MDA koncentracijai kraujo serume. Be to, didžiausia išspaudų dozė sumažino vidutinį paros svorio prieaugį ir pablogino pašarų konversijos rodiklį [128].

Galima teigti, kad tyrimų, nagrinėjančių vynuogių kilmės produktų poveikį galvijams, vis dar yra nedaug. Dauguma jų rodo teigiamą poveikį antioksidacinės sistemos aktyvumui, oksidacinio streso mažinimui bei imuniniam atsakui, tačiau poveikis augimo ir produktyvumo rodikliams nėra panašūs. Gauti skirtumai gali būti susiję su naudojamų produktų chemine sudėtimi, polifenolių koncentracija, papildų dozėmis, šėrimo trukme, gyvulių amžiumi bei fiziologine būkle. Todėl būtini tolesni tyrimai, siekiant įvertinti vynuogių produktų poveikį mėsinių galvijų reprodukcijai, ypač *postpartum* laikotarpiu,

kai dėl padidėjusio oksidacinio streso ir uždegiminių procesų antioksidacinė apsauga tampa ypač svarbi.

1.6. Šiuolaikinės reprodukcijos stebėsenos technologijos mėsinėje galvijininkystėje

Reprodukcinės funkcijos gerinimas yra tik viena efektyvaus reprodukcijos valdymo dalis. Ne mažiau svarbus veiksnys yra savalaikis rujos nustatymas ir optimalus apvaisinimo laiko parinkimas, nuo kurių tiesiogiai priklauso apsivaisinimo sėkmė bei bandos reprodukciniai rodikliai. Todėl tradicinius reprodukcijos stebėsenos metodus vis dažniau papildo tiksliosios gyvulininkystės technologijos, leidžiančios objektyviai ir realiuoju laiku vertinti gyvulių fiziologinius bei elgsenos pokyčius. Tradiciniai reprodukcijos valdymo metodai, kurie daugiausia remiasi vizualiniu rujos nustatymu ir apvaisinimu, tampa vis neefektyvesni augant bandos dydžiui. Subjektyvios diagnostinės klaidos dar labiau padidina su šiais įprastais metodais susijusį neefektyvumą [129]. Siekiant pašalinti šiuos apribojimus, naudojamos pažangios stebėjimo technologijos, kurios vaidina vis svarbesnį vaidmenį šiuolaikiniame galvijų reprodukcijos valdyme. Jutiklių pagrindu veikiančios sistemos, tokios kaip akselerometrai, leidžia realiuoju laiku stebėti galvijų aktyvumo lygį, pateikiant objektyvius duomenis, naudojamus rujai nustatyti, ir sumažinant priklausomybę nuo vizualinio stebėjimo. Be to, infraraudonųjų spindulių termografija (IRT) siūlo neinvazinį metodą rujos pradžiai nustatyti, aptinkant subtilius kūno temperatūros svyravimus, taip pagerinant apvaisinimo laiko tikslumą ir bendrą reprodukcinį efektyvumą [130].

Nepaisant akivaizdžių šių pažangių technologijų privalumų, jų diegimą stabdo finansinės ir techninės kliūtys. Didelės pradinės investicijos ir specializuotų duomenų interpretavimo žinių poreikis gali apriboti platų diegimą, ypač mažuose ir vidutinio dydžio ūkiuose. Tačiau nuolatinė technologijų pažanga ir patogių naudoti, ekonomiškų sprendimų kūrimas gali pagerinti prieinamumą, taip pagerinant reprodukcinį efektyvumą mėsinių galvijų pramonėje.

1.6.1. Rujos ciklo fiziologija

Rujos ciklas – tai fiziologinių, hormoninių ir morfologinių pokyčių visuma, vykstanti karvės reprodukcinėje sistemoje nuo vienos rujos iki kitos. Nors šie pokyčiai veikia visą organizmą, ryškiausiai jie pasireiškia reprodukciniuose organuose. Rujos ciklo eigą lemia daugybė tarpusavyje susijusių veiksnių, tarp kurių svarbiausi yra gyvulio mityba, laikymo technologija, aplinkos sąlygos bei bendroji organizmo fiziologinė būklė [131].

Normaliomis fiziologinėmis sąlygomis karvių rujos ciklas kartojasi kas 17–24 dienas, tačiau jo trukmė gali skirtis priklausomai nuo gyvulio amžiaus, veislės, produktyvumo bei aplinkos veiksnių. Rujos ciklas laikomas normaliu, kai ruja pasireiškia ne dažniau kaip kas 17 dienų ir ne rečiau kaip kas 24 dienas. Šį ciklą reguliuoja sudėtinga neuroendokrininė sistema, kurios pagrindiniai reguliaciniai centrai yra pagumburis, hipofizė ir kiaušidės. Hipofizė išskiria folikulus stimuliuojantį hormoną (FSH) ir liuteinizuojantį hormoną (LH), kurie koordinuoja folikulų augimą, jų brendimą bei ovuliaciją. FSH skatina pirminių ir antrinių folikulų vystymąsi, o dominuojantis folikulas sintetina estradiolį, kuris lemia rujai būdingų elgsenos ir fiziologinių požymių pasireiškimą bei didina reprodukcinių organų kraujotaką. Ovuliacijos metu plyšus subrendusiam folikului jo vietoje formuojasi geltonkūnis, gaminantis progesteroną – hormoną, būtiną veršingumo palaikymui ir normaliai reprodukcinės sistemos funkcijai užtikrinti [131].

Rujos metu karvėms pasireiškia specifiniai elgsenos pokyčiai, kurie naudojami reprodukcinei būklei įvertinti. Literatūroje šių požymių aprašymas gali šiek tiek skirtis, priklausomai nuo taikytų tyrimo metodų ir vertinimo kriterijų. Vieni būdingiausių rujos požymių yra padidėjęs gyvulio aktyvumas, neramumas, dažnesnis kitų karvių uostinėjimas, smakro atrėmimas į kitų gyvulių nugarą, Flehmeno reakcija bei bandymai užšokti ant kitų bandos gyvulių [132]. Be šių požymių, rujos metu karvėms būdingas intensyvesnis laižymasis, trynimasis į kitus gyvulius ar aplinkos objektus, padidėjęs agresyvumas, suvelti ar pašiaušti uodegos gumburo plaukai ar purvina ketera, nerimas. Rujojančios karvės laiko padėjusios galvą ant kitos karvės pasturgalio, vaikšto patvory, uostinėja arba laižo kitas karves [133]. Patikimiausias rujos požymis yra, kai karvė leidžiasi kitoms karvėms ant jos šokti ir šokimo ant jos metu stovi – tai yra tinkamiausias vaisingo periodo požymis. Šis požymis laikomas svarbiausiu natūraliu reprodukcinio ciklo indikatoriumi.

Vidutinė aktyvios rujos trukmė karvėms paprastai siekia 15–18 valandų, nors bendras rujos laikotarpis gali svyruoti nuo 8 iki 30 valandų . Per vieną rujos ciklą karvė vidutiniškai leidžia ant jos užšokti arba pati užšoka ant kitų gyvulių 20–55 kartus, o vieno tokio kontakto trukmė paprastai siekia 3–7 sekundes [134]. Nustatyta, kad didžioji dalis rujos elgsenos požymių pasireiškia vakare ir naktį – nuo 18 iki 6 valandos ryto, kai užregistruojama apie 68 proc. visų užšokimų [135].

Nors daugelį rujos požymių galima nustatyti vizualiai stebint gyvulių elgseną, dalis fiziologinių ir elgsenos pokyčių yra subtilūs, trumpalaikiai arba pasireiškia naktį, todėl praktinėmis ūkių sąlygomis jie dažnai lieka nepastebėti. Dėl šios priežasties vis plačiau taikomos šiuolaikinės tiksliosios gyvulininkystės technologijos, leidžiančios objektyviai ir nepertraukiamai registruoti gyvulių aktyvumo pokyčius. Aktyvumo jutikliai, akselerometrai, pedometrai

bei kitos išmaniosios stebėsenos sistemos leidžia tiksliai nustatyti padidėjusį judėjimo intensyvumą, žingsnių skaičiaus pokyčius ir kitus elgsenos parametrus, kurie būdingi rujos laikotarpiui. Šių technologijų taikymas padidina rujos nustatymo tikslumą, leidžia parinkti optimalų sėklinimo laiką ir prisideda prie reprodukcinių rodiklių gerinimo.

1.6.2. Moderniosios rujos nustatymo technologijos

Tikslus ir savalaikis rujos nustatymas yra viena svarbiausių efektyvaus galvijų reprodukcijos valdymo sąlygų. Nors daugelyje ūkių vizualus gyvulių stebėjimas išlieka dažniausiai taikomu rujos nustatymo metodu, jo efektyvumą riboja trumpa stebėjimo trukmė, žmogiškasis faktorius bei ne visuomet ryškiai pasireiškiantys rujos požymiai. Ypač sudėtinga nustatyti pirmąją rują po veršiavimosi, nes pirmoji ovuliacija gali įvykti nepasireiškus aiškiems rujos elgsenos požymiams. Tokia būklė vadinama tyliąja ruja – tai ovuliacija, vykstanti be nustatomų elgseninių rujos požymių [136]. Nustatyta, kad po apsiveršiavimo iki 42 proc. karvių pasireiškia tylioji ruja, todėl vien vizualus stebėjimas dažnai neužtikrina pakankamo rujos nustatymo tikslumo [137].

Siekiant padidinti reprodukcijos valdymo efektyvumą, vis plačiau taikomos automatinės gyvulių stebėsenos ir rujos nustatymo sistemos. Jos leidžia nuolat registruoti fiziologinius ir elgsenos rodiklius bei sumažinti subjektyvaus vertinimo įtaką. Pagal registruojamus rodiklius ir taikomą technologiją šias sistemas galima suskirstyti į aktyvumo ir akselerometrijos, atrajojimo registravimo, kūno temperatūros registravimo, RFID (radijo dažnio atpažinimo technologija) ir lokalizacijos, infraraudonųjų spindulių termografijos (IRT) bei daugiaparametrines sistemas. Duomenims interpretuoti vis plačiau taikomi ir dirbtinio intelekto bei mašininio mokymosi metodai, leidžiantys analizuoti vieno ar kelių jutiklių generuojamus duomenis ir automatiškai identifikuoti rujai būdingus pokyčius [22, 30, 134, 138]. Pagrindinės rujos nustatymui taikomos technologijos, jų registruojami rodikliai, privalumai ir trūkumai apibendrinti 1.6.2.1 lentelėje.

1.6.2.1 lentelė. *Rujos nustatymui taikomų technologijų charakteristikos*

Technologija	Registruojamas rodiklis	Pagrindinis privalumas	Pagrindinis trūkumas	Taikymas rujos nustatymui
Vizualinis stebėjimas	Elgsena	Mažos investicijos	Priklauso nuo darbuotojo	Vidutinis
Pedometras	Žingsniai / aktyvumas	Paprastas, nepertraukiamas	Mažas specifiškumas	Geras
Akselerometras	3D judėjimas, gulėjimas, stovėjimas	Daug parametrų	Kaina, duomenų analizė	Geras–labai geras
Intrarumeninis boliusas	Temperatūra, aktyvumas ir kt.	Nuolatinis fiziologinis monitoringas	Invazinis įdėjimas, kaina	Geras
IRT	Paviršiaus temperatūra	Bekontaktis metodas	Labai priklauso nuo aplinkos	Papildomas
Daugiaparametrė DI sistema	Elgsena + fiziologija	Kompleksinis vertinimas	Algoritmų validavimo poreikis	Potencialiai labai geras

Aktyvumo ir akselerometrijos sistemos. Dauguma automatinių rujos nustatymo sistemų remiasi fizinio aktyvumo stebėsena, nes rujos laikotarpiu dažnai padidėja gyvulio judrumas. Dažniausiai naudojami ant kaklo arba galūnių tvirtinami akselerometrai, registruojantys judėjimo intensyvumą ir aktyvumo pokyčius. Ant galūnių tvirtinami jutikliai taip pat gali suteikti informacijos apie stovėjimo, gulėjimo ir judėjimo trukmę. Nuolatinė šių rodiklių stebėsena leidžia nustatyti individualaus gyvulio įprasto aktyvumo pokyčius ir identifikuoti rujai būdingą aktyvumo padidėjimą [139–143]. Integruojant aktyvumo duomenis su bandos valdymo sistemomis galima tiksliau parinkti sėklinimo laiką ir efektyviau valdyti reprodukciją.

Atrajojimo registravimo sistemos. Rujos nustatymui gali būti naudojami ir atrajojimo bei pašaro vartojimo pokyčiai. Kai kurios komercinės stebėsenos sistemos kartu su fiziniu aktyvumu registruoja atrajojimo trukmę, pašaro vartojimo intensyvumą ir kitus elgsenos rodiklius [139–143]. Šių parametrų vertinimas kartu su aktyvumo pokyčiais gali suteikti papildomos informacijos apie gyvulio fiziologinės būklės pokyčius ir padėti identifikuoti reprodukcinio ciklo pokyčius.

Kūno temperatūros registravimo sistemos. Kūno temperatūros pokyčiai taip pat gali būti naudojami kaip papildomas reprodukcinės būklės rodiklis. Temperatūra gali būti registruojama skirtingose kūno vietose arba naudojant vidinius jutiklius, o nuolatinė jos stebėsena leidžia vertinti individualius temperatūros svyravimus ir jų sąsajas su reprodukcinio ciklo fazėmis [30, 134,

138]. Kadangi kūno temperatūrai įtakos gali turėti ne tik reprodukcinė būklė, bet ir aplinkos temperatūra, fizinis aktyvumas, vandens vartojimas ir sveikatos būklė, šio parametro interpretavimas yra ypač aktualus kartu su kitais fiziologiniais ir elgsenos rodikliais.

RFID ir lokalizacijos sistemos. RFID technologijos pirmiausia naudojamos individualiam gyvulių identifikavimui ir jų susiejimui su automatiškai registruojamais duomenimis. Integravus RFID su lokalizacijos ir bandos valdymo sistemomis galima registruoti gyvulio buvimo vietą, judėjimą tarp skirtingų fermos zonų, apsilankymus prie šėryklų ir girdyklų bei kitus elgsenos parametrus. Tokia informacija gali papildyti aktyvumo stebėseną ir būti naudojama reprodukcinės būklės pokyčiams vertinti.

Infraraudonųjų spindulių termografija (IRT). IRT yra nekontaktinis metodas, leidžiantis registruoti kūno paviršiaus temperatūros pasiskirstymą ir jo pokyčius. Reprodukcinio ciklo metu vykstantys fiziologiniai ir hormoniniai pokyčiai gali būti susiję su periferinės kraujotakos ir paviršinės temperatūros kitimu, todėl IRT vertinama kaip potencialus papildomas rujos nustatymo metodas. Šios technologijos privalumas yra galimybė atlikti matavimus be tiesioginio kontakto su gyvuliu, tačiau rezultatams įtakos gali turėti aplinkos sąlygos ir pasirinkta matavimo sritis [22].

Daugiaparametrinės sistemos. Kadangi nė vienas atskirai registruojamas rodiklis nėra specifiškas tik rujai, vis daugiau šiuolaikinių sistemų vienu metu analizuoja kelis fiziologinius ir elgsenos parametrus. Tokios sistemos gali integruoti aktyvumo, atrajojimo, kūno temperatūros, vandens suvartojimo, lokalizacijos ar kitus duomenis. Kelių nepriklausomų rodiklių derinimas sudaro galimybes kompleksiškiau vertinti gyvulio būklę ir sumažinti klaidingų rujos nustatymo atvejų tikimybę [22, 30, 134, 138].

Dirbtinio intelekto ir mašininio mokymosi metodais pagrįsta duomenų analizė. Tiksliosios gyvulininkystės technologijų plėtra vis labiau siejama su dirbtinio intelekto ir mašininio mokymosi metodų taikymu. Skirtingai nuo atskirų jutiklių technologijų, šie metodai pirmiausia naudojami surinktiems duomenims analizuoti ir interpretuoti. Jie leidžia apdoroti didelius iš skirtingų jutiklių gaunamų duomenų kiekius ir automatiškai identifikuoti rujai būdingus elgsenos bei fiziologinių rodiklių derinius. Michelena ir kt. [22] nurodo, kad modernios stebėsenos sistemos gali integruoti akselerometrų, infraraudonųjų spindulių termografijos kamerų bei temperatūros jutiklių duomenis, sudarydamos galimybę kompleksiškai vertinti reprodukcinę gyvulio būklę. Mašininio mokymosi algoritmai gali būti naudojami rujai klasifikuoti, jos pradžiai prognozuoti ir automatiniams perspėjimams generuoti [22].

Nepaisant automatinių stebėsenos sistemų pažangos, tikslus rujos nustatymas išlieka aktualia problema. Atskirų jutikliais registruojamų rodiklių pokyčiai nėra būdingi tik rujai, nes gyvulių aktyvumui, atrajojimui ir kūno tem-

peratūrai įtakos gali turėti sveikatos būklė, aplinkos sąlygos, šėrimas, stresas ir individualios gyvulio savybės. Be to, automatinių sistemų rujos nustatymo tikslumas priklauso nuo naudojamo jutiklio, duomenų registravimo dažnio ir taikomo algoritmo, todėl skirtingomis sąlygomis jų jautrumas ir specifiškumas gali skirtis. Ypač sudėtingas išlieka silpnai išreikštos arba tyliosios rujos nustatymas, kai elgsenos pokyčiai yra nežymūs ir vien aktyvumo duomenų gali nepakakti patikimam rujos identifikavimui. Todėl aktualu vertinti kelių fiziologinių ir elgsenos rodiklių derinius bei ieškoti metodų, leidžiančių padidinti rujos nustatymo tikslumą.

1.6.3. Pedometrai ir akselerometrai

Pedometrai ir akselerometrai yra vienos plačiausiai taikomų tiksliosios gyvulininkystės technologijų, skirtų galvijų rujos nustatymui. Šių jutiklių veikimas pagrįstas nuolatiniu gyvulių fizinio aktyvumo registravimu, todėl galima objektyviai įvertinti elgsenos pokyčius, būdingus rujos laikotarpiui. Nustatyta, kad rujos metu karvių judėjimo intensyvumas reikšmingai padidėja, todėl aktyvumo pokyčiai laikomi vienu patikimiausių reprodukcinės būklės rodiklių [143].

Pedometrai registruoja gyvulio žingsnių skaičių ir leidžia nustatyti padidėjusį aktyvumą, susijusį su rujos pradžia. Tyrimai parodė, kad radiotelemetriniai pedometrai gali tiksliai identifikuoti rują Japonijos juodųjų galvijų veislės karvėms, nustatydami reikšmingą žingsnių skaičiaus padidėjimą tiek įprastos, tiek tyliosios rujos metu [143]. Panašius rezultatus pateikė Yoshioka ir kt., kurie patvirtino, kad pedometrai yra patikima priemonė rujos nustatymui, analizuojant gyvulių aktyvumo pokyčius [144]. Tikslus rujos nustatymas leidžia optimaliai parinkti sėklinimo laiką ir taip padidinti reprodukcinį efektyvumą bei ekonominį mėsinių galvijų auginimo efektyvumą.

Akselerometrai suteikia galimybę išsamiau įvertinti gyvulių elgseną ir fiziologinę būklę. Šie jutikliai registruoja judėjimo intensyvumą bei kryptį trimatėje erdvėje, todėl leidžia ne tik nustatyti bendrą aktyvumą, bet ir analizuoti konkrečius elgsenos modelius. Richeson ir kt. pabrėžė trijų ašių akselerometrų svarbą nuolatinei galvijų elgsenos stebėsenai, kuri leidžia anksti nustatyti sveikatos sutrikimus, šlubavimą bei reprodukcinei būklei būdingus pokyčius [145]. Robért ir kt. nustatė, kad belaidžiai akselerometrai leidžia tiksliai registruoti gulėjimo ir stovėjimo trukmę, vaikščiojimo intensyvumą bei poilsio laiko pokyčius, kurie laikomi svarbiais gyvulių gerovės ir reprodukcinės būklės rodikliais. Pastebėta, kad rujos metu mažėja poilsio trukmė, o stovėjimo ir judėjimo laikas reikšmingai padidėja [146].

Naujausios aktyvumo stebėsenos sistemos integruoja radijo dažnio identifikavimo (RFID) technologijas, leidžiančias nepertraukiamai registruoti gy-

vulių aktyvumą ir poilsį. Fromm ir kt. parodė, kad ultragarsinio aukšto dažnio RFID sistemos leidžia nustatyti net ir nedidelius aktyvumo pokyčius, susijusius su skirtingomis rujos ciklo fazėmis, todėl suteikia galimybę anksčiau nustatyti rują ir laiku priimti reprodukcijos valdymo sprendimus [147].

Daugelis autorių pabrėžia, kad aktyvumo stebėsenos technologijos yra naudingos ne tik reprodukcijos valdymui, bet ir bendrai gyvulių sveikatos stebėsenai. Nuolatinis aktyvumo, vandens suvartojimo, elgsenos registravimas leidžia anksti nustatyti nukrypimus nuo fiziologinės normos, įvertinti gyvulių gerovę bei operatyviai koreguoti bandos valdymo sprendimus, taip mažinant galimus ekonominius nuostolius [26, 27, 147–149].

Pastaraisiais metais vis didesnę reikšmę įgauna nešiojamieji jutikliai, leidžiantys realiuoju laiku registruoti įvairius fiziologinius rodiklius ir nuotoliniu būdu stebėti reprodukcinę gyvulių būklę. Automatizuotas duomenų rinkimas ir analizė sumažina subjektyvaus vertinimo įtaką bei leidžia greitai priimti sprendimus dėl optimalaus sėklinimo laiko [150]. Vis dėlto skirtingų tipų jutikliai registruoja nevienodus parametrus, todėl jų efektyvumas priklauso nuo pasirinktos technologijos. Ant kaklo ar galūnių tvirtinami akselerometrai ypač tiksliai registruoja padidėjusį fizinį aktyvumą, neramumą ir kitus rujos metu pasireiškiančius elgsenos pokyčius.

Didėjant surenkamų duomenų kiekiui, vis dažniau taikomi dirbtinio intelekto ir mašininio mokymosi metodai. Neethirajan ir kt. parodė, kad elgsenos ir fiziologinius parametrus registruojančių jutiklių integravimas su pažangiais duomenų analizės algoritmais leidžia nustatyti subtilius, tačiau nuosekliai pasikartojančius rujos pradžios požymius, todėl reikšmingai padidėja rujos nustatymo tikslumas ir reprodukcinis efektyvumas [151].

Svarbią vietą šiuolaikinėje reprodukcijos stebėsenoje užima ir elektroninai boliusai. Nustatyta, kad „Smaxtec“ sistema, registruojanti didžiojo prieskrandžio temperatūrą ir aktyvumą, leidžia nustatyti fiziologinius pokyčius, vykstančius prieš rują ir jos metu. Šios technologijos taikymas padeda sumažinti sėklinimo indeksą, sutrumpinti laikotarpį nuo apsiveršiavimo iki sėklinimo bei pagerinti bendrą reprodukcinį efektyvumą [149]. Be to, nustatyta, kad naudojant boliusus mažėja abortų dažnis bei brokavimo dėl reprodukcinių ligų atvejų skaičius, todėl gerėja bandos ekonominiai rodikliai [152].

Jutiklių pasirinkimas priklauso nuo ūkio tipo, bandos dydžio, gyvulių laikymo sąlygų bei reprodukcijos valdymo tikslų. Ūkiuose, kuriuose taikoma intensyvi galvijų auginimo technologija ir gyvuliai didžiąją laiko dalį laikomi uždarose patalpose, efektyviai naudojami įvairūs aktyvumo, atrajojimo, kūno temperatūros ir lokalizacijos jutikliai, kurių registruojami duomenys realiuoju laiku perduodami į bandos valdymo programas. Tuo tarpu ekstensyviuose mėsinių galvijų ūkiuose, kuriuose gyvuliai didžiąją metų dalį ganomi didelėse teritorijose, vizuali stebėsena yra apsunkinta, todėl ypač svarbu naudoti

patvarius, autonomiškai veikiančius ir minimalios priežiūros reikalaujančius jutiklius. Tokios sistemos turi būti atsparios aplinkos veiksniams, užtikrinti ilgą baterijos veikimo laiką ir patikimą duomenų perdavimą net esant ribotam ryšio prieinamumui [23].

1.6.4. Infraraudonųjų spindulių termografija reprodukcijos stebėsenai

Infraraudonųjų spindulių termografija (IRT) yra viena sparčiausiai tobulėjančių neinvazinių technologijų, taikomų galvijų fiziologinių ir reprodukcinių procesų stebėsenai. Šis metodas leidžia nuotoliniu būdu registruoti kūno paviršiaus temperatūros pokyčius ir įvertinti fiziologinius procesus, nesukeliant gyvuliui papildomo streso ar diskomforto. Pirmieji tyrimai, nagrinėję kūno temperatūros pokyčius rujos ciklo metu, buvo atlikti dar XX a. viduryje ir sudarė prielaidas tolimesnei termografijos taikymo reprodukcijos tyrimuose plėtrai [153].

Tradiciniai kūno temperatūros matavimo metodai, pavyzdžiui, tiesiosios žarnos temperatūros registravimas skaitmeniniais termometrais, pasižymi pakankamu tikslumu, tačiau jų taikymas yra invazinis, reikalauja tiesioginio kontakto su gyvuliu ir gali sukelti papildomą stresą. Be to, matavimo rezultatams įtakos turi gyvulio fiksavimo būdas, matavimo laikas bei kiti procedūriniai veiksniai [154, 155]. Dėl šių priežasčių pastaraisiais metais vis daugiau dėmesio skiriama infraraudonųjų spindulių termografijai, kuri leidžia greitai, bekontakčiu būdu ir realiuoju laiku registruoti net nedidelius kūno paviršiaus temperatūros pokyčius.

Viena svarbiausių IRT taikymo sričių yra rujos nustatymas. Periferinės kūno temperatūros pokyčiai, ypač vulvos ir akių srityse, yra susiję su rujos metu vykstančiais endokrininiais pokyčiais, kurie skatina vietinės kraujotakos suintensyvėjimą ir kraujagyslių išsiplėtimą [25, 33]. Dėl šių fiziologinių pokyčių infraraudonųjų spindulių termografija leidžia neinvaziškai registruoti paviršinės temperatūros kitimus, kurie gali būti naudojami kaip papildomi rujos diagnostikos rodikliai. Akių paviršiaus temperatūra taip pat laikoma sisteminės fiziologinės ir metabolinės būklės indikatoriumi, atspindinčiu organizmo atsaką į stresą, uždegiminius procesus ir termoreguliacijos pokyčius [130]. Todėl termografinių duomenų analizė kartu su gyvulių elgsenos rodikliais suteikia išsamesnę informaciją apie reprodukcinio ciklo metu vykstančius fiziologinius pokyčius ir gali padidinti rujos nustatymo tikslumą. Nustatyta, kad rujos metu karvių vulvos paviršiaus temperatūra padidėja, palyginti su nerujojančiomis karvėmis, todėl šis rodiklis gali būti taikomas kaip papildoma priemonė reprodukcinei būklei įvertinti [156].

Marquez ir kt. nustatė, kad rujos laikotarpiu karvių akių ir vulvos paviršiaus temperatūra padidėja, o infraraudonųjų spindulių termografija kartu su elgsenos rodiklių analize leidžia tiksliau nustatyti rujos pradžią ir optimizuoti sėklinimo laiką [156]. Nustatyta, kad likus maždaug dviem paroms iki rujos pradžios kūno temperatūra šiek tiek sumažėja, o prieš pat ovuliaciją, sutampant su liuteinizuojančio hormono (LH) koncentracijos padidėjimu, staiga padidėja [157]. Šie temperatūros pokyčiai glaudžiai susiję su hormoniniais ir elgsenos pokyčiais, todėl jų stebėsena leidžia tiksliau prognozuoti ovuliacijos laiką ir parinkti optimalų sėklinimo momentą. Vis dėlto vien tik temperatūros matavimas ne visada užtikrina pakankamą tikslumą, nes temperatūros kitimus gali lemti ir kiti fiziologiniai ar aplinkos veiksniai. Dėl šios priežasties rekomenduojama termografinius duomenis vertinti kartu su aktyvumo stebėsenos rezultatais, reprodukciniais įrašais ar kitais fiziologiniais rodikliais [158].

Be rujos nustatymo, infraraudonųjų spindulių termografija vis dažniau taikoma ankstyvai veršingumo diagnostikai. Tyrimai parodė, kad akių, snukio, šonų ir vulvos sričių temperatūros skirtumai leidžia atskirti veršingas ir neveršingas karves jau praėjus maždaug 24 dienoms po sėklinimo [159]. Ankstyvas veršingumo nustatymas suteikia galimybę operatyviai planuoti pakartotinį sėklinimą, efektyviau valdyti reprodukcinius procesus bei didinti bandos reprodukcinį efektyvumą.

IRT gali būti taikoma ir reprodukcinės sistemos patologijų diagnostikai. Nustatyta, kad gimdos uždegimai, tokie kaip metritas ar endometritas, bei kai kurie kiaušidžių funkcijos sutrikimai sukelia lokalius temperatūros pokyčius, kuriuos galima registruoti termografinėmis kameromis dar prieš pasireiškiant ryškiems klinikiniams požymiams [160]. Tokia ankstyva diagnostika leidžia laiku taikyti gydymą ir sumažinti reprodukcinių ligų daromą neigiamą poveikį bandos produktyvumui. Be to, termografija taikoma ir bulių reprodukciniam potencialui vertinti, analizuojant kapšelio temperatūrą bei jos pasiskirstymą, kurie atspindi sėklidžių funkciją ir spermos kokybę [161].

Įvairūs autoriai patvirtino, kad infraraudonųjų spindulių termografija gali būti sėkmingai taikoma skirtingų veislių galvijams. Radigonda ir kt. nustatė, kad vulvos temperatūros pokyčiai leidžia patikimai nustatyti rują Braford veislės karvėms [162]. Ozaki ir kt. parodė, kad Japonijos Juodųjų karvių akių, vulvos ir dubens srities temperatūros stebėsena leidžia prognozuoti ovuliaciją net ir silpnai pasireiškus rujos požymiams, nors metodo tikslumas mažėja esant folikulinėms cistoms [163]. Kiti autoriai nustatė, kad vulvos temperatūra tiksliau atspindi hormoninius rujos ciklo pokyčius nei akių ar snukio temperatūra, kuri labiau priklauso nuo bendros kūno temperatūros ir aplinkos sąlygų [164]. Taip pat įrodyta, kad termografinė akių temperatūros analizė gali būti naudojama ne tik reprodukcijai, bet ir bendrai gyvulių sveikatos bei

gerovės stebėsenai [165]. Kang ir kt. parodė, kad termografinės sistemos, kartu analizuojančios gyvulių aktyvumą ir pašaro suvartojimą, leido tiksliai nustatyti rują Hanwoo veislės mėsiniams galvijams [166].

Nepaisant didelio diagnostinio potencialo, infraraudonųjų spindulių termografijos taikymas turi ir tam tikrų apribojimų. Kūno paviršiaus temperatūrą veikia daugybė fiziologinių veiksnių, tokių kaip kraujotakos intensyvumas, audinių metabolinis aktyvumas, odos storis, plaukų danga, odos pigmentacija bei poodinių riebalų sluoksnis [167]. Be to, matavimų tikslumui didelę įtaką daro aplinkos temperatūra, oro drėgmė, vėjas, tiesioginė saulės spinduliuotė bei odos paviršiaus užterštumas. Todėl, siekiant užtikrinti patikimus rezultatus, būtina standartizuoti matavimo sąlygas ir taikyti vienodus tyrimo protokolus [162, 167].

1.7. Inovatyvių technologijų taikymo apribojimai ir gyvūnų gerovė

Nors tiksliosios gyvulininkystės technologijos reikšmingai pagerina rujos nustatymo tikslumą ir reprodukcijos valdymą, jų taikymas praktinėmis sąlygomis susiduria su tam tikrais techniniais ir organizaciniais iššūkiais. Vienas svarbiausių apribojimų yra jutiklių patikimumas bei ilgaamžiškumas, ypač ekstensyviuose mėsinių galvijų ūkiuose, kur gyvuliai nuolat veikiami įvairių aplinkos sąlygų. Drėgmė, dulkės, temperatūros svyravimai ir mechaniniai pažeidimai gali sumažinti jutiklių veikimo tikslumą bei sutrumpinti jų eksploatacijos laiką [168].

Dauguma šiuolaikinių stebėsenos sistemų pagrįstos belaidžiu duomenų perdavimu, todėl jų veikimas priklauso nuo stabilaus interneto ryšio ir elektros tiekimo. Atokiose vietovėse ryšio trikdžiai gali apsunkinti nepertraukiamą duomenų registravimą ir sumažinti stebėsenos efektyvumą. Nors kuriami autonominiai, saulės energija maitinami įrenginiai, jų diegimą vis dar riboja ekonominiai ir techniniai veiksniai [168].

Svarbi problema išlieka ir jutiklių tvirtinimas prie gyvulio. Ant kaklo, galūnių ar kitose kūno vietose pritvirtinti jutikliai dėl natūralaus galvijų elgesio gali būti mechaniškai pažeidžiami, pasislinkti arba nukristi, todėl ne visada užtikrinamas nenutrūkstamas ir tikslus duomenų registravimas [168]. Be to, daugumos nešiojamųjų jutiklių veikimą riboja baterijų talpa, todėl ilgalaikė stebėsena didelėse bandose reikalauja periodinės priežiūros, baterijų keitimo ar įkrovimo, o tai didina darbo sąnaudas ir eksploatacijos išlaidas.

Nepaisant spartaus technologijų vystymosi, automatinės rujos nustatymo sistemos negali visiškai pakeisti gyvulių stebėjimo. Rujos nustatymo tikslumą gali mažinti netinkamas jutiklių kalibravimas, individualūs gyvulių elgsenos skirtumai bei nepakankamai tikslūs duomenų analizės algoritmai. Todėl

jutiklių registruojami duomenys turėtų būti vertinami kartu su kitais reprodukciniais ir klinikiniais rodikliais [169].

Diegiant tiksliosios gyvulininkystės technologijas svarbu užtikrinti, kad jų taikymas nedarytų neigiamo poveikio gyvūnų gerovei. Netinkamai parinkti arba netinkamai pritvirtinti jutikliai gali sukelti diskomfortą, pakeisti natūralią gyvulių elgseną ar padidinti traumų riziką. Todėl technologijų diegimas turi būti grindžiamas ne tik techniniu efektyvumu, bet ir gyvūnų gerovės principais. Tinkamai parinktos ir prižiūrimos stebėsenos sistemos leidžia pagerinti reprodukcijos valdymą, kartu išsaugant gyvūnų sveikatą, komfortą ir gerovę [168–170].

Apibendrinant literatūros apžvalgą galima teigti, kad mėsinių galvijų reprodukcinis efektyvumas priklauso nuo daugelio tarpusavyje susijusių fiziologinių, metabolinių ir valdymo veiksnių. Viena svarbiausių sėkmingos reprodukcijos prielaidų yra savalaikis reprodukcinės sistemos atsistatymas po apsiveršiavimo, kurį lemia gimdos involiucija, kiaušidžių veiklos atsinaujinimas, hormonų pusiausvyra, veršelio žindymas, mitybos būklė bei oksidacinio streso intensyvumas. Vis daugiau mokslinių tyrimų rodo, kad *postpartum* laikotarpiu svarbų vaidmenį atlieka ne tik endokrininiai procesai, bet ir gimdos mikrobiota bei organizmo oksidacinė būklė, kurios gali turėti tiesioginę įtaką reprodukcinės funkcijos atsikūrimui.

Pastaraisiais metais didelis dėmesys skiriamas augalinės kilmės bioaktyviesiems junginiams, ypač vynuogių kilmės polifenoliams, pasižymintiems antioksidaciniu, priešuždegiminiu ir imunomoduliaciniu poveikiu. Nors dauguma tyrimų rodo teigiamą jų įtaką antioksidacinės sistemos aktyvumui bei uždegiminių procesų mažinimui, duomenys apie poveikį galvijų reprodukcijai, ypač mėsinių karvių laikotarpiu po apsiveršiavimo, išlieka riboti ir nevienareikšmiai. Be to, iki šiol trūksta tyrimų, kuriuose būtų kompleksiškai vertinamas polifenolių poveikis reprodukciniams rodikliams kartu analizuojant fiziologinius, hormoninius ir elgsenos pokyčius.

Literatūros duomenys taip pat rodo, kad vien reprodukcinės funkcijos gerinimo nepakanka – ne mažiau svarbu tiksliai ir laiku nustatyti rują. Dėl to šiuolaikinėje mėsinėje galvijininkystėje vis plačiau taikomos tiksliosios gyvulininkystės technologijos, leidžiančios neinvaziškai ir nepertraukiamai stebėti gyvulių fiziologinius bei elgsenos pokyčius. Aktyvumo jutikliai, infraraudonųjų spindulių termografija, didžiojo prieskrandžio temperatūros stebėsena ir dirbtinio intelekto pagrindu veikiančios analizės sistemos sudaro galimybes objektyviau nustatyti rują ir optimizuoti reprodukcijos valdymą.

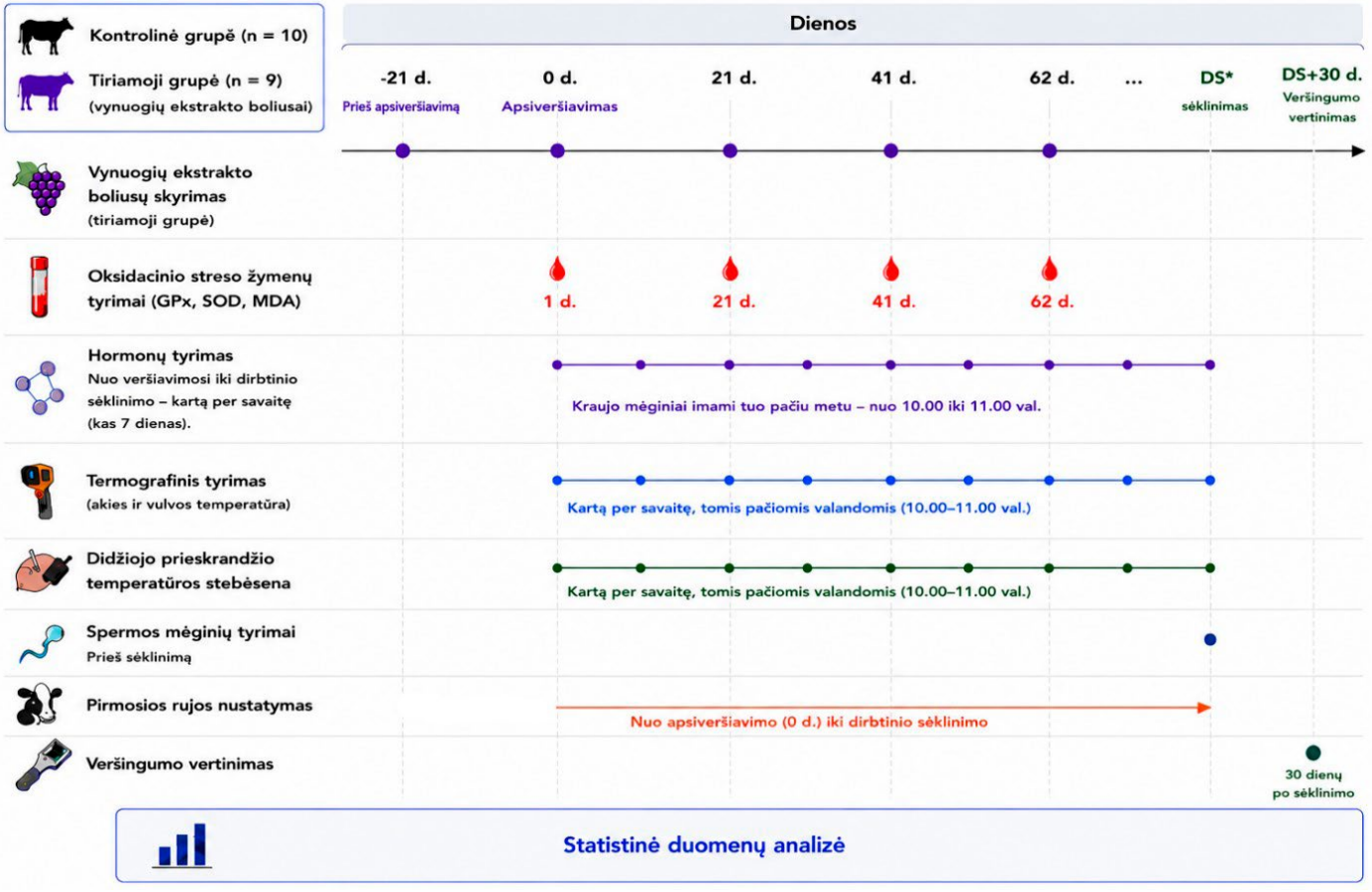
Nepaisant sparčios pažangos, iki šiol stokojama tyrimų, kuriuose būtų kompleksiškai vertinamas augalinės kilmės polifenolių poveikis mėsinių galvijų reprodukcijai, tarpusavyje susiejant oksidacinio streso, hormoninius, elgsenos, termografinius ir didžiojo prieskrandžio temperatūros rodiklius. Mūsų

atliktos literatūros paieškos duomenimis, publikuotų tyrimų, kuriuose būtų kompleksiškai vertinamas vynuogių polifenolių turinčio ekstrakto poveikis Lietuvos sąlygomis auginamų mėsinių galvijų reprodukcinei būklei, kartu taikant šiuolaikines fiziologinių ir elgsenos rodiklių stebėsenos technologijas, nepavyko nustatyti. Todėl šiame darbe gauti rezultatai papildo mokslines žinias apie mėsinių galvijų reprodukcinius procesus laikotarpiu po apsiveršiavimo ir sudaro prielaidas įvertinti vynuogių ekstrakto bei šiuolaikinių reprodukcijos stebėsenos technologijų taikymo galimybes mėsinių galvijų ūkiuose.

2. DARBO METODIKA

Mokslinis darbas buvo atliekamas 2021–2026 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Gyvulininkystės institute. Visos su gyvūnais susijusios procedūros buvo atliktos laikantis 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyvos 2010/63/ES dėl moksliniams tikslams naudojamų gyvūnų apsaugos reikalavimų [171]. Tyrimas taip pat vykdytas vadovaujantis Lietuvos Respublikos gyvūnų gerovės ir apsaugos įstatymu (Nr. IX–2271) [172] bei Lietuvos Respublikos Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos patvirtintais teisės aktais, reglamentuojančiais eksperimentuose naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros, naudojimo ir gerovės reikalavimus [173]. Tyrimas patvirtintas Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Gyvulininkystės instituto tarybos posėdyje (protokolo Nr. 24/01/30/01). Tyrimo metodika patvirtinta metodinės komisijos posėdyje (protokolo Nr. 23/05/30/01).

Biocheminiai bei hormonų tyrimai atlikti Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademijos Stambiųjų gyvūnų klinikos Gyvūnų reprodukcijos laboratorijoje, oksidacinio streso žymenų tyrimai atlikti Neuromokslų instituto Biochemijos laboratorijoje, gimdos mikrobiotos tyrimai atlikti „Zymo Research“ laboratorijoje (Irvine, Kalifornija, JAV). Tiriamojo darbo schema pateikta 2.1 pav.



2.1 pav. *Tyrimo schema*

2.1. Tyrimo objektas

Tyrimas atliktas su 19 Angus veislės galvijų, kurių amžius buvo nuo 2 iki 10 metų. Į tyrimą buvo įtrauktos telyčios ir karvės, vidutinis veršiavimųsi skaičius siekė 2,8. Per pirmąsias 24 valandas po veršiavimosi visoms karvėms atliktas klinikinis tyrimas, kurio metu matuota kūno temperatūra, vertinta didžiojo prieskrandžio peristaltika, nustatytas pulso ir kvėpavimo dažnis. Taip pat atliktas biocheminis kraujo serumo tyrimas automatiniu biocheminiu analizatoriumi „Selectra Junior“. Remiantis Merck žinyne pateiktomis normos ribomis, nukrypimų nenustatyta [174]. Į tyrimą įtrauktos tik kliniškai sveikos karvės, kurios veršiavosi savarankiškai, be veterinarijos gydytojo pagalbos, ir kurioms nenustatyta reprodukcinių sutrikimų ar komplikacijų.

Tyrimo pradžioje visų gyvulių kūno masės indeksas buvo 3,0–3,5 pagal penkiabalę vertinimo sistemą, t. y., atitiko rekomenduojamą kūno įmitimą mėsiniams galvijams. Telyčios buvo laikomos reprodukciškai sveikomis, jei klinikinio ištyrimo metu nebuvo nustatyta reprodukcijos organų patologijų, jos buvo pasiekusios veislei būdingą lytinę brandą, turėjo reguliarų lytinį ciklą ir jų kūno masė sudarė 60–75 proc. suaugusios karvės kūno masės. Karvės reprodukciškai sveikomis buvo laikomos tuomet, kai nenustatyta reprodukcijos organų patologijų, veršiavimasis vyko be komplikacijų bei *postpartum* laikotarpiu nepasireiškė reprodukciniai sutrikimai.

Daugiaveršės karvės į tiriamąsias grupes buvo paskirstytos atsižvelgiant į veršiavimųsi skaičių, siekiant užtikrinti grupių palyginamumą, o telyčios paskirstytos atsitiktinės atrankos būdu. Kontrolinę grupę (K; n = 10) sudarė keturios telyčios ir šešios karvės, kurių vidutinis veršiavimųsi skaičius buvo 2,8. Tiriamąją grupę (T; n = 9) sudarė keturios telyčios ir penkios karvės, kurių vidutinis veršiavimųsi skaičius siekė 2,9. Kontrolinės grupės gyvuliams papildai nebuvo skiriami, o tiriamosios grupės karvės gavo lėto veikimo sausojo vynuogių (*Vitis vinifera*) ekstrakto boliusus.

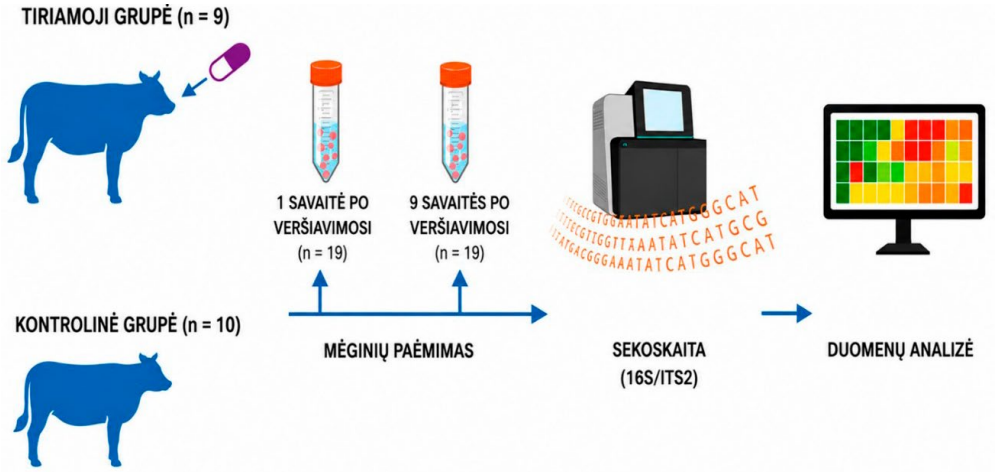
Visos karvės buvo laikomos laisvo laikymo tvarte Baisogaloje (Radviliškio r., Lietuva). Tyrimas vykdytas nuo kovo iki birželio mėnesio. Naudojantis ūkyje taikoma reprodukcijos valdymo programa, sėklinimas buvo atliekamas praėjus 60–70 dienų po veršiavimosi. Likus 21 dienai iki numatomos veršiavimosi datos ir iki 60–70 dienų po veršiavimosi karvės buvo laikomos šiaudais kreiktuose veršiavimosi garduose, atskirtuose nuo pagrindinės bandos. Visą tyrimo laikotarpį gyvuliai buvo šeriami visaverčiu pašaru ir turėjo neribotą prieigą prie geriamojo vandens. Pašarų racioną sudarė 65 proc. žolės siloso, 25 proc. kukurūzų siloso, 7 proc. kviečių šiaudų ir 3 proc. kombinuotųjų pašarų (kukurūzų, kviečių ir rapsų). Pašarai buvo duodami vieną kartą per dieną.

Tiriamosios grupės karvėms buvo sugirdomi lėto veikimo boliusai, kurių kiekviename buvo 14,8 g sausojo vynuogių (*Vitis vinifera*) ekstrakto. Boliusai buvo sugirdomi naudojant nerūdijančio plieno aplikatorių (Ø 34 mm; Bio Enterprise BV, Vroomshoop, Nyderlandai), užtikrinant jų patekimą į didįjį prieskrandį. Kiekvienai karvei tyrimo laikotarpiu buvo sugirdyta po penkis boliusus. Vynuogių ekstrakto boliusai pradėti skirti likus 21 dienai iki numatomos veršiavimosi datos. Vėliau jie buvo skiriami veršiavimosi dieną bei praėjus 21, 42 ir 63 dienoms po veršiavimosi. Visais atvejais boliusai buvo sušeriami tuo pačiu paros metu – nuo 10.00 iki 11.00 val.

Vynuogių ekstraktas buvo inkapsuliuotas į augalinės kilmės matricą, kuri sumažino greitą biologiškai aktyvių junginių skaidymą prieskrandyje ir užtikrino laipsnišką ekstrakto išsiskyrimą tinklainyje maždaug per tris savaites. Naudotame ekstrakte bendras polifenolių kiekis viršijo 60 proc., iš jų daugiau kaip 45 proc. sudarė proantocianidinai, o antocianinų kiekis buvo didesnis kaip 0,3 proc.

2.2. Gimdos mikrobiotos tyrimai

Siekiant įvertinti gimdos mikrobiotos pokyčius *postpartum* laikotarpiu, iš tų pačių karvių mėginiai buvo imami du kartus. Gyvuliai buvo suskirstyti į dvi tiriamąsias grupes: tiriamąją grupę (n = 9), kuriai buvo skiriami lėto veikimo sausojo vynuogių (*Vitis vinifera*) ekstrakto boliusai, ir kontrolinę grupę (n = 10), kuriai papildai nebuvo skiriami. Gimdos mėginiai iš visų karvių buvo paimti pirmąją ir devintąją savaitę po veršiavimosi. Tyrimo schema pateikta 2.2.1 paveiksle.



2.2.1 pav. *Gimdos mikrobiotos tyrimo schema*

2.2.1. Gimdos mėginių paėmimas

Prieš imant gimdos mėginius kiekvienos fiksuotos karvės vulvos sritis nuplauta vandeniu, dezinfekuota 70 proc. etanolio tirpalu ir nusausinta vienkartiniu popieriniu rankšluosčiu. Per makštį ir gimdos kaklelį į gimdos kūną atsargiai buvo įvesta sterili plastikinė sėklinimo pipetė. Siekiant užtikrinti tikslų pipetės įvedimą į gimdą, procedūros metu papildomai naudotas ultragarso aparatas. Ultragarsinis tyrimas atliktas nešiojamuoju ultragarso aparatu Easi–Scan Go su 7,5 MHz dažnio linijiniu rektiniu zondu (BCF™ Technology Ltd., Livingstonas, Jungtinė Karalystė).

Į gimdą buvo sušvirkšta 30 ml sterilaus fiziologinio tirpalo. Po to gimda švelniai masažuota per tiesiąją žarną, siekiant, kad tirpalas susimaišytų su gimdos skysčiais. Vėliau gimdos skystis buvo pritrauktas atgal į švirkštą. Gauto mėginio tūris kito nuo 5 iki 15 ml. Mėginiai nedelsiant perkelti į iš anksto paženklintus sterilius 15 ml mėgintuvėlius, sudėti į termoizoliacinę transportavimo dėžę su ledu ir per 2–3 valandas nugabenti į laboratoriją tolesniam apdorojimui.

Iš kiekvieno mėginio paimtas vienodas tūris medžiagos ir sujungtas į bendrą jungtinį mėginį, kuris buvo sumaišytas su DNR/RNR apsauginiu tirpalu (*DNA/RNA Shield*; Zymo Research, Irvine, Kalifornija, JAV) ir steriliuose kriogeniniuose mėgintuvėliuose buvo laikomas Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Mikrobiologijos ir virusologijos institute –80 °C temperatūroje. Vėliau mėginiai, buvo transportuoti į „Zymo Research“ laboratoriją (Irvine, Kalifornija, JAV), kur atlikta bakterijų 16S rRNR geno ir grybų ITS2 regiono amplikonų sekoskaita.

Siekiant sumažinti tyrimo sąnaudas ir atlikti pirminį gimdos mikrobiotos tyrimą, prieš sekoskaitą vienodo tūrio individualūs mėginiai buvo sujungti į bendrus mėginius. Nors toks metodas neleidžia įvertinti individualių kiekvieno gyvulio mikrobiotos skirtumų, jis suteikė galimybę atlikti pirminę mėsinių galvijų gimdos mikrobiotos sudėties analizę ir sudarė pagrindą tolesniems išsamesniems tyrimams.

2.2.2. Bakterijų (16S rRNR) ir grybų (ITS2) amplikonų sekoskaita

Gimdos mikrobiotos tyrimai buvo atlikti „Zymo Research“ laboratorijoje (Irvine, Kalifornija, JAV), naudojant ZymoBIOMICS® Targeted Sequencing Service platformą. Tyrimų metu išskirta genominė DNR, paruoštos sekoskaitos bibliotekos ir atlikta tikslinių amplikonų sekoskaita.

Genominė DNR iš gimdos plovimo mėginių buvo išskirta naudojant ZymoBIOMICS® DNA Miniprep Kit rinkinį (Zymo Research, Irvine, Kalifornija, JAV). Bakterijų bendrijos sudėčiai nustatyti polimerazės grandinine reakcija (PGR) buvo amplifikuotas 16S rRNR geno V3–V4 regionas, naudo-

jant Quick–16S™ NGS Library Prep Kit rinkinyje esančius pradmenis (Zymo Research, Irvine, Kalifornija, JAV). Grybų bendrijai tirti amplifikuotas ITS2 regionas, naudojant Quick–ITS™ Plus NGS Library Prep Kit ir Microbiota Sequencing Services ITS2 Primer Set pradmenų rinkinį (Zymo Research, Irvine, Kalifornija, JAV).

Sekoskaitos bibliotekos buvo paruoštos taikant realaus laiko polimerazės grandininę reakciją (PGR), kuri leido tiksliai kontroliuoti amplifikacijos ciklų skaičių ir sumažinti chimerinių sekų susidarymo tikimybę. Gauti PGR rezultatai buvo kiekybiškai įvertinti taikant kiekybinę PGR (qPGR), po to vienodomis molinėmis koncentracijomis sujungti į bendrą biblioteką. Bibliotekos buvo išgrynintos naudojant Select–a–Size DNA Clean & Concentrator™ rinkinį (Zymo Research, Irvine, Kalifornija, JAV), o jų kokybė ir koncentracija įvertinta TapeStation® sistema (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, JAV) bei Qubit® fluorometru (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Masačusetsas, JAV).

Tyrimo kokybei užtikrinti kartu su mėginiais buvo analizuojami teigiami ir neigiami kontroliniai mėginiai. DNR išskyrimo proceso kontrolei naudotas ZymoBIOMICS® Microbial Community Standard, o bibliotekų paruošimo kokybei vertinti – ZymoBIOMICS® Microbial Community DNA Standard. Siekiant įvertinti galimą mėginių užterštumą, lygiagrečiai buvo tiriami ir neigiami kontroliniai mėginiai, apimantys tuščius DNR išskyrimo bei bibliotekų paruošimo mėginius.

Bakterijų 16S rRNR amplikonų sekoskaita atlikta Illumina® NextSeq™ platformoje (Illumina Inc., San Diegas, Kalifornija, JAV), naudojant P1 reagentų rinkinį, 600 ciklų sekoskaitos režimą ir 30 proc. PhiX kontrolės priemaišą. Grybų ITS2 amplikonų sekoskaita atlikta Illumina® NextSeq 2000™ platformoje (Illumina Inc., San Diegas, Kalifornija, JAV), naudojant P1 reagentų rinkinį, 600 ciklų sekoskaitos režimą ir 25 proc. PhiX kontrolės priemaišą.

Gauti sekoskaitos duomenys pirmiausia buvo apdoroti pašalinant žemos kokybės sekas ir adapterių fragmentus. Unikalūs amplikonų sekų variantai (ASV, angl. *Amplicon Sequence Variants*) buvo nustatyti naudojant DADA2 bioinformatinį algoritmą [175], o susidariusios chimerinės sekos pašalintos iš tolimesnės analizės.

Mikroorganizmų taksonominė klasifikacija atlikta naudojant Uclust algoritmą QIIME v.1.9.1 programinėje aplinkoje [176]. Taksonų identifikacijai naudotos „Zymo Research“ sukurtos ir kuruojamos vidinės 16S rRNR ir ITS sekų duomenų bazės. Mikrobų bendrijų sudėtis ir įvairovė analizuota naudojant QIIME v.1.9.1 programinę įrangą.

Statistiškai reikšmingai besiskiriantys mikroorganizmų taksonai nustatyti taikant LEfSe v1.1.2 (*Linear Discriminant Analysis Effect Size*) analizės

metodą [177], naudojant numatytuosius programos parametrus. Mikrobiotos struktūrai ir skirtumams tarp tiriamųjų grupių vizualizuoti sudaryti šiluminiai žemėlapiai (*heatmaps*), Taxa2ASV analizės diagramos bei pagrindinių koordinačių analizės (PCoA, angl. *Principal Coordinates Analysis*) grafikai, naudojant laboratorijoje sukurtas bioinformatines analizės priemones.

Bakterijų ir grybų kiekis mėginiuose buvo nustatytas taikant kiekybinę polimerazės grandininę reakciją (qPGR). Kiekybiniam vertinimui naudoti plazmidinės DNR etalonai, kuriuose buvo po vieną 16S rRNR ir ITS2 regiono kopiją. Kalibracinės kreivės sudarytos naudojant dešimteriopų nuosekliųjų praskiedimų serijas.

Nustatytas genų kopijų skaičius buvo perskaičiuotas į mikroorganizmų genomų kopijų skaičių, darant prielaidą, kad viename bakterijos genome vidutiniškai yra keturios 16S rRNR geno kopijos, o viename grybo genome – apie 200 ITS2 regiono kopijų. DNR masė apskaičiuota remiantis *Escherichia coli* genomo dydžiu ($4{,}64 \times 10^6$ bp) bakterijoms ir *Saccharomyces cerevisiae* genomo dydžiu ($1{,}20 \times 10^7$ bp) grybams.

2.3. Oksidacinio streso žymenų tyrimai

Glutationo peroksidazės (GPx), superoksido dismutazės (SOD) ir malondialdehido (MDA) koncentracijos kraujo serume buvo nustatytos fermentiniu imunosorbentiniu metodu (ELISA), naudojant komercinius galvijų mėginiams skirtus tyrimų rinkinius: GPx – „MyBioSource“ (MBS289398), SOD – „Cusabio“ (CSB–E14090B), MDA – „MyBioSource“ (MBS739193). Tyrimai atlikti pagal gamintojų pateiktas metodikas.

Iki analizės kraujo serumo mėginiai buvo laikomi –80 °C temperatūroje. Prieš tyrimą mėginiai buvo atšildyti kambario temperatūroje ir atsargiai homogenizuoti. GPx ir SOD analizei buvo naudojamas neskiestas kraujo serumas, o MDA analizei skirti mėginiai prieš tyrimą buvo centrifuguojami 1000 × g 10 min. ir skiedžiami 2 kartus. Standartiniai tirpalai ir tiriamieji mėginiai buvo analizuojami dviem pakartojimais.

Tiriamųjų rodiklių koncentracijos buvo apskaičiuotos pagal kiekvienam tyrimui sudarytas kalibracines kreives. Optinis tankis buvo matuojamas mikroplokštelių skaitytuvu „Infinite 200 PRO“ („Tecan“, Männedorf, Šveicarija). Galutinės GPx, SOD ir MDA koncentracijos pateiktos tyrimų rinkinių gamintojų nurodytais matavimo vienetais.

2.3.1. Glutationo peroksidazės (GPx) tyrimas

Glutationo peroksidazės (GPx) koncentracija buvo nustatyta naudojant komercinį galvijų GPx tyrimo rinkinį „MyBioSource“ (MBS289398), dvigubo antikūno (sandwich ELISA) metodu [178]. Mikroplokštelės šulinėliai buvo

padengti specifiniais galvijų GPx antikūnais. Į šulinėlius buvo įpilti standartiniai tirpalai ir tiriamieji serumo mėginiai, kuriuose esanti GPx prisijungė prie imobilizuotų antikūnų. Po inkubacijos buvo įpilti biotinu pažymėti specifiniai antikūnai, o vėliau – krienų peroksidaze (HRP) pažymėto avidino konjugatas. Po kiekvieno inkubacijos etapo mikroplokštelė buvo plaunama, siekiant pašalinti neprisijungusius reagentus.

Vėliau į šulinėlius buvo įpilta tetrametilbenzidino (TMB) substrato. Fermentinės reakcijos metu susidariusio spalvinio produkto intensyvumas buvo proporcingas GPx koncentracijai mėginyje. Reakcija buvo sustabdyta rūgštiniu tirpalu, o optinis tankis išmatuotas 450 nm bangos ilgio šviesoje. GPx koncentracija apskaičiuota pagal standartinių tirpalų pagrindu sudarytą kalibracinę kreivę.

2.3.2. Superoksido dismutazės (SOD) tyrimas

Superoksido dismutazės (Cu/Zn–SOD) koncentracija buvo nustatyta naudojant komercinį galvijų SOD tyrimo rinkinį „Cusabio“ (CSB–E14090B), dvigubo antikūno (sandwich ELISA) metodu [179]. Į specifiniais Cu/Zn–SOD antikūnais padengtus mikroplokštelės šulinėlius buvo įpilti standartiniai tirpalai ir tiriamieji serumo mėginiai. Po inkubacijos buvo įpilti biotinu pažymėti antikūnai prieš Cu/Zn–SOD, o vėliau – krienų peroksidaze (HRP) pažymėto avidino konjugatas. Po kiekvieno inkubacijos etapo šulinėliai buvo plaunami plovimo tirpalu, siekiant pašalinti neprisijungusius reagentus.

Vėliau į šulinėlius buvo įpilta tetrametilbenzidino (TMB) substrato, o pasibaigus fermentinei reakcijai – stabdymo tirpalo. Optinis tankis buvo išmatuotas 450 nm bangos ilgio šviesoje, taikant 570 nm korekcinį bangos ilgio filtrą. Cu/Zn–SOD koncentracija apskaičiuota pagal keturių parametrų logistinės regresijos (4–PL) kalibracinę kreivę.

2.3.3. Malondialdehido (MDA) tyrimas

Malondialdehido (MDA) koncentracija buvo nustatyta naudojant komercinį „MyBioSource“ (MBS739193) tyrimo rinkinį konkurenciniu (competitive ELISA) metodu [180]. Mėginyje esantis MDA konkuravo su krienų peroksidaze (HRP) pažymėtu MDA konjugatu dėl prisijungimo prie specifinių antikūnų, esančių mikroplokštelės šulinėliuose. Į šulinėlius buvo įpilti standartiniai tirpalai ir tiriamieji serumo mėginiai, o vėliau – HRP pažymėtas MDA konjugatas. Po vienos valandos inkubacijos mikroplokštelės šulinėliai buvo penkis kartus plaunami plovimo tirpalu.

Po plovimo į šulinėlius buvo įpilti substratai A ir B. Fermentinės reakcijos metu susidarė mėlynos spalvos produktas, o reakciją sustabdžius stabdymo

tirpalu spalva pakito į geltoną. Optinis tankis buvo išmatuotas 450 nm bangos ilgio šviesoje. Kadangi tyrimas pagrįstas konkurenciniu principu, spalvos intensyvumas buvo atvirkščiai proporcingas MDA koncentracijai mėginyje – didėjant MDA koncentracijai, optinis tankis mažėjo. MDA koncentracija apskaičiuota pagal standartinių tirpalų pagrindu sudarytą kalibracinę kreivę, atsižvelgiant į taikytą 2 kartų skiedimo koeficientą.

2.4. Hormonų tyrimas

Nuo veršiavimosi iki sėklinimo iš visų karvių kartą per savaitę, kas 7 dienas, buvo imami kraujo mėginiai. Siekiant sumažinti paros ritmo įtaką fiziologiniams rodikliams, mėginiai visais atvejais buvo imami tuo pačiu metu – nuo 10.00 iki 11.00 val.

Kraujo mėginiai iš *v. coccygeal* aseptiškai buvo paimami į 9 ml vakuuminius mėgintuvėlius be antikoagulianto („VACUTEST“, Verona, Italija). Surinkti kraujo mėginiai 30–60 min. buvo laikomi kambario temperatūroje, kad susidarytų krešulys. Vėliau mėginiai buvo centrifuguojami 3000 × g greičiu 5 min., atskirtas kraujo serumas perpilamas į sterilius mėgintuvėlius ir laikomas –60 °C temperatūroje iki hormoninių tyrimų atlikimo.

Progesterono ir estradiolio koncentracijos kraujo serume nustatytos Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademijos Gyvūnų reprodukcijos laboratorijoje. Hormonų koncentracijos buvo tiriamos fermentinio imunologinio tyrimo (ELISA) metodu, naudojant komercinius progesterono (RE52231) ir 17β–estradiolio (RE52041) tyrimų rinkinius („IBL International GmbH“, Hamburgas, Vokietija) pagal gamintojo pateiktą metodiką.

Prieš tyrimą reagentams leidžiama pasiekti kambario temperatūrą ir paruošiamas 40× koncentracijos plovimo tirpalas. Naudojant programą KC4 (JAV) sukuriamas tyrimo protokolas, nurodant reakcijos tipą (absorbcija), bangos ilgį (450 ± 10 nm), standartų (0 ng/ml, 0,3 ng/ml, 1,25 ng/ml, 2,5 ng/ml, 5 ng/ml, 15 ng/ml ir 40 ng/ml) ir kontrolių koncentracijas bei standartų, kontrolių ir mėginių vietas tyrimų plokštelėje. Plokštelių skaitytuvu (BIO–TEK Synergy HT, JAV) išmatuojamas absorbcinės bangos ilgis. Rezultatai automatiškai apskaičiuoti pagal 4 parametrų logistikos kreivę. Kambario temperatūrą pasiekę mėginiai išmaišomi purtykle (MS1 Minishaker, IKA, Vokietija).

Progesterono ir estradiolio koncentracijos mėginiuose nustatymo eiga:

1. Į atitinkamus plokštelės šulinėlius įpilama po 25 µl standartų, kontrolės ir mėginių. Inkubuojama 5 min. kambario temperatūroje.
2. Į visus šulinėlius įpilama po 200 µl fermento konjugato bei plokštelės turinys 10 sek. sukamaisiais judesiais pamaišomas. Inkubuojama 60 min. kambario temperatūroje.

3. Po inkubacijos plokštelės turinys išpilamas ir plokštelė nusausinama. Į visus šulinėlius įpilama po 400 µl plovimo tirpalo ir po kiekvieno plovimo plokštelė nusausinama. Plovimas pakartojamas 3 kartus.
4. Į visus šulinėlius įpilama po 200 µl substrato tirpalo. Inkubuojama 15 min. kambario temperatūroje.
5. Į visus šulinėlius įpilama po 100 µl sustabdymo tirpalo. Plokštelė nuskaitoma per 10 min. nuo paskutinio etapo pabaigos.

Progesterono nustatymo matavimo diapazonas buvo 0,140–40 ng/ml, o analitinis jautrumas – 0,045 ng/ml. Pakartojamumo (angl. *intra-assay*) variacijos koeficientas siekė 5,4–7,0 proc., o variacijos koeficientas tarp tyrimo serijų (angl. *inter-assay*) – 4,3–10,0 proc. 17β–estradiolio nustatymo matavimo diapazonas buvo 10,6–2000 pg/ml, o analitinis jautrumas – 10,6 pg/ml. Pakartojamumo variacijos koeficientas siekė 8,7–9,2 proc., o variacijos koeficientas tarp tyrimo serijų – 6,9–14,9 proc.

2.5. Termografinis tyrimas

Kartu su kraujo mėginių ėmimu buvo atliekami neinvaziniai kūno paviršiaus temperatūros matavimai, taikant infraraudonųjų spindulių termografijos metodą. Akių ir vulvos paviršiaus temperatūra buvo matuojama nešiojamu infraraudonųjų spindulių termovizoriumi FLIR E540 („FLIR Systems“, Santa Barbara, Kalifornija, JAV). Prietaiso matavimo tikslumas buvo ±2 °C, terminis jautrumas (NETD) – 0,03 °C, vaizdo skiriamoji geba – 464 × 348 taškai, o matuojamų temperatūrų diapazonas siekė nuo –20 iki 400 °C.

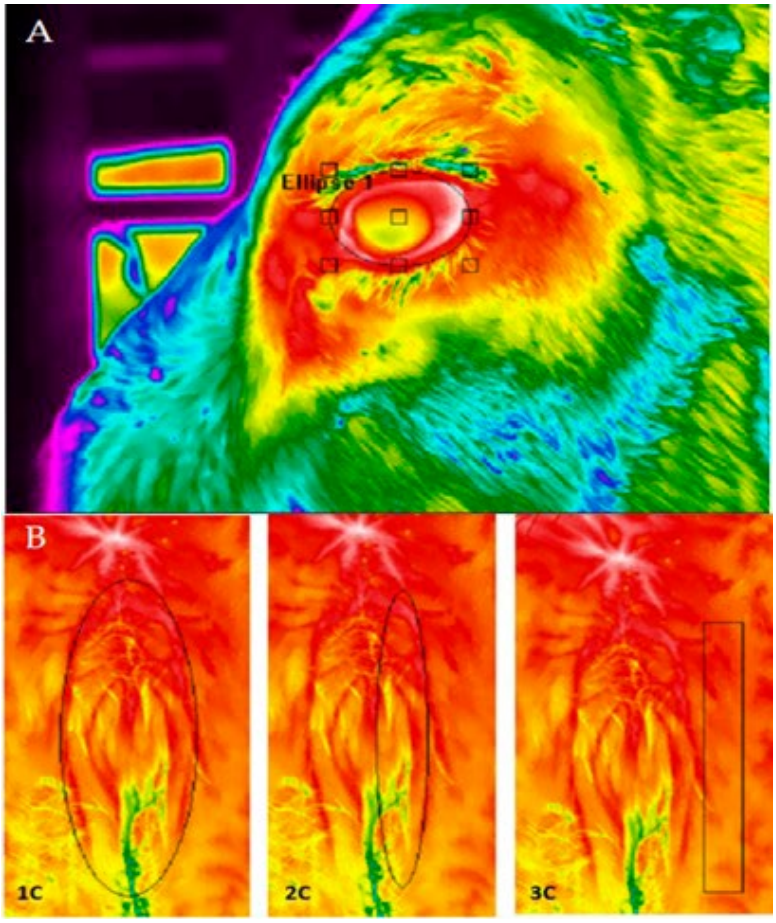
Atliekant matavimus spinduliavimo koeficientas (emisija) buvo nustatytas 0,98, atitinkantis gyvūnų biologinių audinių emisijos koeficientą. Termografinių tyrimų metu tvarte esanti aplinkos temperatūra ir santykinė oro drėgmė buvo registruojamos skaitmeniniu termohigrometru ThermoPro TP50 („ThermoPro“, Šenženas, Kinija). Šie duomenys buvo įtraukiami į FLIR ResearchIR programinės įrangos nustatymus, siekiant sumažinti aplinkos veiksnių įtaką temperatūros matavimų tikslumui. Tyrimo laikotarpiu aplinkos temperatūra kito nuo 18 iki 22 °C, o santykinė oro drėgmė – nuo 40 iki 63 proc.

Termografiniai vaizdai buvo registruojami maždaug vieno metro atstumu nuo gyvulio, laikantis vienodų matavimo sąlygų uždarose patalpose. Siekiant užtikrinti matavimų tikslumą ir pakartojamumą, buvo vengiama tiesioginių saulės spindulių, skersvėjo ir drėgmės poveikio.

Termografiniai vaizdai buvo analizuojami naudojant FLIR ResearchIR programinę įrangą (4.40 versija; „Teledyne FLIR“, Wilsonville, Oregonas, JAV). Vaizdams atvaizduoti naudota vaivorykštinė spalvų skalė, kurioje žemiausia temperatūra buvo žymima tamsiai mėlyna, aukščiausia – balta spalva, o tarpinės temperatūros atitiko pereinamąsias spalvas.

Kiekvienoje dominančioje anatominėje srityje buvo apskaičiuota vidutinė, mažiausia ir didžiausia paviršiaus temperatūra. Kiekvieno matavimo metu iš kiekvienos anatominės srities buvo užregistruoti trys termografiniai vaizdai, o analizei pasirinktas geriausios kokybės vaizdas, kuriame anatominė sritis buvo aiškiausiai matoma ir tinkamai sufokusuota. Visi termografiniai matavimai buvo atliekami to paties tyrėjo, naudojant vienodą atstumą iki gyvulio, fotografavimo kampą, aplinkos sąlygas ir programinės įrangos nustatymus, nors dėl gyvulių padėties ar fotografavimo kampo galėjo pasitaikyti nedidelių skirtumų.

Statistinei analizei naudota didžiausia paviršiaus temperatūra, nes ji pasižymėjo didžiausiu matavimo patikimumu ir mažiausiu rezultatų kintamumu (2.5.1 pav.).



2.5.1 pav. *Termografiniai vaizdai ir temperatūros matavimo sritys tirtuose anatominiuose regionuose. (A) akių sritis; (B) vulvos sritis; (1C) visa vulvos sritis; (2C) centrinė pailga vulvos sritis; (3C) vulvą supanti sritis*

2.6. Didžiojo prieskrandžio temperatūros stebėsena

Didžiojo prieskrandžio temperatūra buvo registruojama viso tyrimo metu kas 10 min, naudojant temperatūros jutiklius (boliusus) smaXtec animal care technology® (Gracas, Austrija). Prieskrandžio temperatūra buvo registruojama automatiniu režimu kas 10 minučių viso tyrimo metu – nuo papildų naudojimo pradžios iki sėklinimo. Kiekvienas boliusas matavo didžiojo prieskrandžio turinio temperatūrą ir belaidžiu ryšiu perduodavo duomenis į ūkyje įrengtas bazines stoteles. Toliau informacija automatiškai buvo siunčiama į centrinę duomenų bazę, kur buvo kaupiama ir saugoma. Pirminis duomenų apdorojimas bei jų vizualizavimas atliktas naudojant programinę įrangą smaXtec messenger® (4 versija). Boliuso matmenys buvo 120 mm ilgio ir 36 mm skersmens, o svoris – 210 g. Ši technologija leido nepertraukiamai registruoti ir realiuoju laiku vertinti didžiojo prieskrandžio temperatūrą ir gyvulių aktyvumą, taip pat automatizuotai nustatyti su ruja ir veršiavimusi susijusius įvykius, sumažinant priklausomybę nuo žmogaus atliekamų stebėjimų.

Boliusai buvo įvedami laikantis gamintojo rekomendacijų, naudojant specialų aplikatorių. Kiekvienai karvei buvo įvestas vienas boliusas. Procedūros metu karvės buvo fiksuojamos garde. Stabilizavus galvą ir atvėrus burną, boliusas buvo padedamas ant liežuvio šaknies, kad gyvulys jį natūraliai nurytų. Dėl savo konstrukcijos, dydžio ir svorio boliusas nusėdo didžiąjame prieskrandyje, kur išliko visą stebėjimo laikotarpį. Po boliuso įvedimo procedūros gyvuliai buvo stebimi maždaug dvi valandas, siekiant įsitikinti, kad boliusas nebuvo atrajotas.

2.7. Spermos mėginių tyrimai

Siekiant išvengti galimos spermos kokybės įtakos sėklinimo indeksui, prieš tyrimą buvo atliktas naudotos kriokonservuotos spermos kokybės įvertinimas. Sėklinimui buvo naudojama Angusų veislės buliaus sperma.

Spermos kokybė buvo vertinama vadovaujantis Lietuvos standarto LST 1467:2022 „Sėklinimui naudojama bulių sperma. Bendrieji reikalavimai“ nuostatomis. Buvo nustatomas spermatozoidų judrumas, koncentracija bei vertinami galvučių, uodegėlių ir kitų morfologinių struktūrų pakitimai.

Prieš atliekant tyrimus spermos šiaudeliai buvo atšildomi 37 ± 0,5 °C temperatūros vandens vonelėje 10 sekundžių. Spermatozoidų judrumas buvo vertinamas šviesiniu mikroskopu (Nikon Eclipse E200, Nikon Corporation, Tokijas, Japonija) su termostatiniu staleliu, palaikančiu 37 °C temperatūrą. Siekiant išvengti temperatūros svyravimų, visi tyrimui naudojami stikleliai ir kitos priemonės prieš naudojimą buvo pašildomi. Judrumas nustatytas subjek-

tyviai, įvertinus judančių spermatozoidų dalį penkiuose mikroskopo matymo laukuose, o galutinis rezultatas apskaičiuotas kaip visų įvertinimų vidurkis.

Spermatozoidų koncentracija nustatyta naudojant Neubauer hemocitometrinę kamerą (Vokietija). Spermos mėginiai buvo skiedžiami distiliuotu vandeniu santykiu 1:20 ir užpildoma skaičiavimo kamera. Skaičiavimas atliktas tris kartus, kiekvieną kartą įvertinant penkis didžiuosius kameros kvadratus (80 mažųjų kvadratėlių), o galutinė koncentracija apskaičiuota pagal Lietuvos standarte pateiktą formulę, perskaičiuojant spermatozoidų skaičių viename mililitre spermos. Atsižvelgiant į vienos spermos dozės tūrį (0,25 ml), papildomai apskaičiuotas spermatozoidų skaičius vienoje spermos dozėje.

Spermatozoidų koncentracija viename spermos ml nustatyta pagal formulę:

$$K = S \times Pr \times 5 \times 10 \times 1000,$$

kurioje K – spermatozoidų skaičius viename spermos ml (koncentracija);
S – spermatozoidų skaičius 80–yje mažų kvadratėlių, vnt.;
Pr – praskiedimo laipsnis, šiuo atveju 20, nes praskiedimas 1 : 20;
5 – koeficientas (spermatozoidai buvo skaičiuojami 0,2 mm^2 kameros plote);
10 – daugiklis (kameros gylis – 0,1 mm);
1 000 – daugiklis (spermatozoidų skaičius perskaičiuojami 1 ml).

Spermatozoidų koncentracija buliaus spermos dozėje apskaičiuojama pagal formulę:

$$SK = K \times 0,25,$$

kurioje K – spermatozoidų skaičius viename spermos ml;
0,25 – daugiklis (buliaus spermos dozės tūris yra 0,25 ml).

Spermatozoidų morfologiniai pakitimai buvo vertinami pagal A. Januškausko metodiką [181]. Galvučių patologijoms nustatyti buvo naudojami Sperm Blue dažai (MICROPTIC S.L., Ispanija). Ant objektinio stiklelio paruoštas spermos tepinėlis buvo išdžiovinamas kambario temperatūroje, merkiamas į fiksavimo tirpalą, vėliau 20–30 min. dažomas ir 3 sek. įmerkiamas į distiliuotą vandenį ir išdžiovinamas ore. Preparatai buvo tiriami naudojant Nikon Eclipse E200 mikroskopą su 100 kartų didinančiu imersiniu objektyvu. Kiekviename mėginyje buvo įvertinta 500 spermatozoidų, apskaičiuojant patologinių galvučių procentinę dalį.

Morfologinio vertinimo metu registruotos įvairios galvučių patologijos (kriaušės formos, siauro pagrindo, pakitusios formos, neišsivysčiusios, pakitusio dydžio bei atsiskyrusios galvutės), uodegėlių defektai (susisukusios, po galvute užlinkusios ar dvigubai sulinkusios uodegėlės) bei kiti pakitimai,

įskaitant vidurinės dalies defektus ir proksimalinius bei distalinius citoplazminius lašelius.

Tirta mėsinio buliaus spermos dozė atitiko bendruosius spermos kokybės reikalavimus.

2.8. Pirmosios rujos po apsiveršiavimo nustatymas

Pirmosios rujos laikas kontrolinės (K) ir tiriamosios (T) grupių karvėms buvo nustatytas remiantis SmaXtec sistemos registruotais vidinės temperatūros duomenimis ir automatiškai apskaičiuotu rujos indeksu. Sistemos pateikti duomenys buvo papildomai vertinami kartu su kassavaitinių klinikinių apžiūrų metu užregistruotais rujos elgsenos požymiais.

Kiekvienai karvei buvo apskaičiuotas laikotarpis nuo veršiavimosi iki pirmosios nustatytos rujos (dienomis). Pirmosios rujos metu užregistruoti akių ir vulvos paviršiaus temperatūros rodikliai, gauti infraraudonųjų spindulių termografijos metodu, buvo lyginami su tuo pačiu laikotarpiu registruota didžiojo prieskrandžio temperatūra, siekiant įvertinti fiziologinius pokyčius, susijusius su rujos pasireiškimu.

Laikotarpis iki pirmosios rujos buvo papildomai įvertintas taikant Kaplano–Mejerio (Kaplan–Meier) išgyvenamumo analizę, kurioje pirmosios rujos pasireiškimas buvo laikomas tiriamuoju įvykiu. Kontrolinės ir tiriamosios grupių kreivės buvo palygintos taikant Log–rank (Mantel–Cox) kriterijų. Sudarytos Kaplano–Mejerio kreivės parodė tikimybę, kad iki tam tikro laikotarpio po apsiveršiavimo momento karvei dar nebus pasireiškusi pirmoji ruja.

2.9. Veršingumo rodiklio įvertinimas

Veršingumo rodiklis buvo apskaičiuotas kaip veršingų karvių skaičiaus ir apsėklintų karvių skaičiaus santykis, išreikštas procentais, pagal Qureshi ir bendraautorių (2008) aprašytą metodiką [28]:

$$\text{Veršingumo rodiklis (\%)} = \frac{\text{Veršingų karvių skaičius}}{\text{Apsėklintų karvių skaičius}} \times 100$$

2.10. Statistinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant IBM SPSS Statistics programinę įrangą (31.0 versija; IBM Corp., Armonk, NY, JAV) ir R programinę aplinką (4.5.2 versija; R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austrija).

Visiems tiriamiesiems rodikliams apskaičiuoti aprašomosios statistikos rodikliai. Duomenys pateikiami kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis (SD) arba mažiausiųjų kvadratų vidurkis ± standartinė paklaida (SE), priklausomai nuo taikyto analizės metodo. Duomenų pasiskirstymo normalumas vertintas taikant Šapiro–Vilko (Shapiro–Wilk) kriterijų bei vizualiai įvertinant histogramas ir normaliojo pasiskirstymo Q–Q grafikus.

Glutationo peroksidazės (GPx), superoksido dismutazės (SOD) ir malondialdehido (MDA) koncentracijų pokyčiai laikui bėgant buvo analizuojami taikant mišriųjų efektų tiesinius modelius (angl. Linear Mixed–effects Models, LMM), kurių parametrai įvertinti ribotojo didžiausio tikėtinumo metodu (REML). Modelyje buvo vertinamas grupės, mėginių ėmimo laiko bei jų sąveikos poveikis, o gyvulys įtrauktas kaip atsitiktinis efektas. Įvertintos kelios kovariacijos struktūros, iš kurių tolesnei analizei pasirinkta pirmos eilės autoregresinė analizė [AR(1)], nes jai buvo nustatytos mažiausios Akaikės (AIC) ir Bajeso (BIC) informacinių kriterijų reikšmės. Modelių fiksuotųjų efektų reikšmingumas vertintas naudojant III tipo dispersinės analizės kriterijų, o vardiklio laisvės laipsniai apskaičiuoti taikant Satterthwaite metodą. Iš modelių apskaičiuoti įvertintieji ribiniai vidurkiai (EMMeans), o poriniai palyginimai atlikti taikant Bonferonio pataisą.

Rujos ir nerujos laikotarpių rodiklių palyginimui taip pat buvo taikyti mišriųjų efektų tiesiniai modeliai, kuriuose fiksuotaisiais efektais laikyta gyvūnų grupė (kontrolinė ir tiriamoji), reprodukcinis laikotarpis (ruja ir neruja) bei jų sąveika, o gyvulys įtrauktas kaip atsitiktinis efektas. Tais atvejais, kai mišriųjų efektų modeliai negalėjo būti pritaikyti dėl duomenų struktūros ar modelio konvergavimo problemų, buvo apskaičiuotas tiriamųjų rodiklių pokytis tarp laikotarpių (ΔY), o šie pokyčiai analizuoti taikant bendrąjį tiesinį modelį (GLM). Efekto dydis įvertintas daliniu eta kvadratu (angl. *partial* η^2).

Ryšiai tarp termografinių, fiziologinių, hormoninių ir elgsenos rodiklių buvo vertinami apskaičiuojant Pirsono koreliacijos koeficientus (r). Koreliacijos analizuotos atskirai kontrolinėje ir tiriamojoje grupėse bei dviem laikotarpiais – viso tyrimo metu ir pirmosios rujos laikotarpiu. Koreliacijų skaičiavimui naudoti visi galimi stebėjimų porų duomenys (angl. *pairwise complete observations*). Siekiant sumažinti daugybinių palyginimų įtaką, p reikšmės koreguotos taikant Benjamini–Hochberg klaidingų atradimų dažnio (FDR) metodą, o pakoreguotos reikšmės pateikiamos kaip q reikšmės. Statistiškai reikšmingomis laikytos koreliacijos, kai $q < 0,05$. Koreliacijos stiprumas vertintas keturiomis kategorijomis: silpnas ($|r| < 0,30$), silpnai vidutinis (0,30–0,49), vidutinis (0,50–0,69) ir stiprus ($\geq 0,70$).

Ryšiai tarp oksidacinio streso žymenų (GPx, SOD ir MDA) papildomai įvertinti taikant pakartotinių matavimų koreliacijos analizę (angl. *Repeated–measures correlation, rmcorr*), kuri leidžia nustatyti bendrą ryšį tarp pakar-

totinai tam pačiam gyvuliui išmatuotų rodiklių, atsižvelgiant į jų tarpusavio priklausomybę. Analizuotos GPx–SOD, GPx–MDA ir SOD–MDA rodiklių poros, o rezultatai pateikiami kaip pakartotinių matavimų koreliacijos koeficientai (rrm) su 95 proc. pasikliautinais intervalais.

Rujos indeksas buvo apskaičiuotas naudojant komercinę debesų kompiuterijos principais veikiančią dirbtinio intelekto sistemą smaXtec animal care technology® (Gracas, Austrija), kuri integruoja elgsenos ir fiziologinių jutiklių duomenis bei gamintojo taikomus korekcinius algoritmus. Kadangi šis indeksas yra kompleksinis skaitmeninis rodiklis, o ne tiesioginis biologinis matavimas, jo rezultatai buvo interpretuojami atsižvelgiant į šią ypatybę.

Visais atvejais statistiškai reikšmingais laikyti skirtumai, kai $p < 0,05$, o kai $0,05 \leq p < 0,10$ – laikyta statistine tendencija.

3.TYRIMŲ REZULTATAI

3.1. Gimdos mikrobiotos tyrimo rezultatai

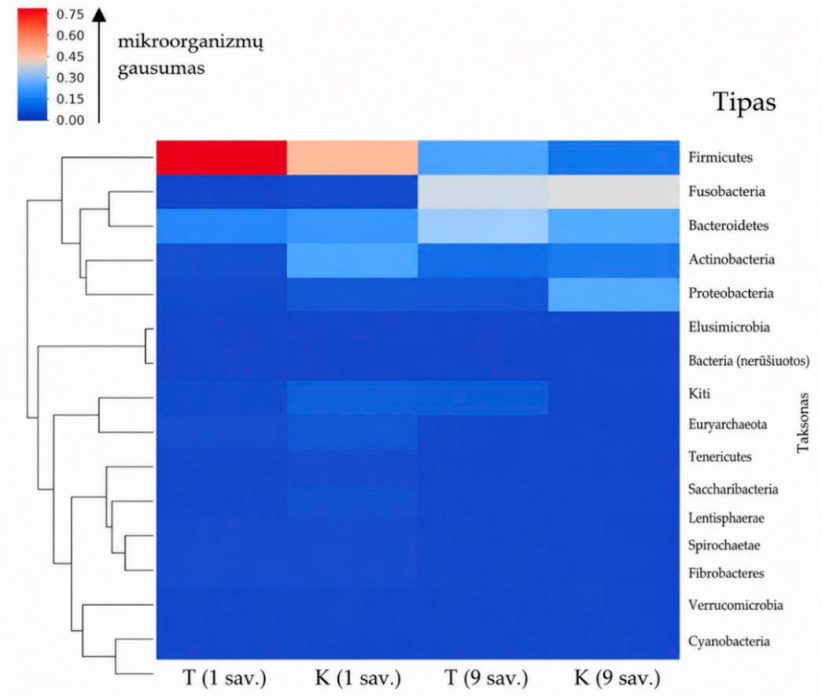
3.1.1. Mėsinių karvių gimdos mikrobiotos bakterinė sudėtis

Mėsinių karvių gimdos bakterinės mikrobiotos taksonominė sudėtis tipų (*Phylum*), būrių (*Order*) ir rūšių (*Species*) lygmenimis pateikta 3.1.1.1 paveiksle.

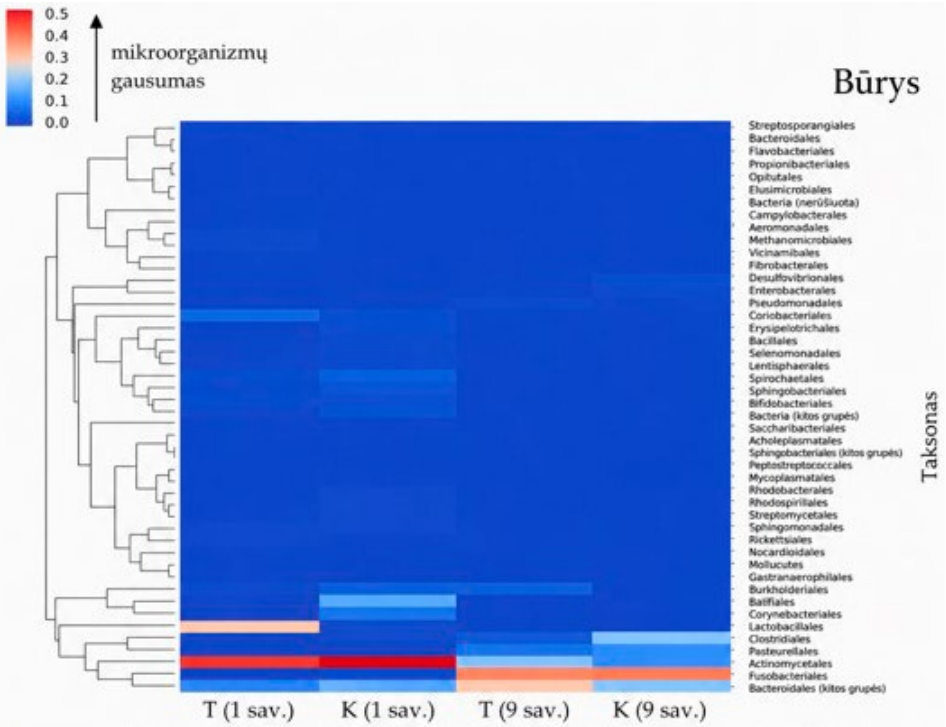
Bakterijų pasiskirstymas tipų lygmeniu kito priklausomai nuo laikotarpio po apsiveršiavimo ir skyrėsi tarp grupių (3.1.1.1 pav.). Pirmąją savaitę po apsiveršiavimo tiek tiriamosios (T (1 sav.)), tiek kontrolinės (K (1 sav.)) grupės karvių gimdos mikrobiotoje dominavo *Firmicutes* tipo bakterijos, o devintąją savaitę abiejose grupėse vyravo *Fusobacteria* tipo bakterijos.

Bakterijų sudėties skirtumai nustatyti ir būrių lygmeniu. Praėjus vienai savaitei po veršiavimosi tiriamojoje grupėje (T (1 sav.)) vyravo *Clostridiales* ir *Lactobacillales* būrių bakterijos, o kontrolinėje grupėje tuo pačiu laikotarpiu (K (1 sav.)) dominavo *Clostridiales* būrio bakterijos.

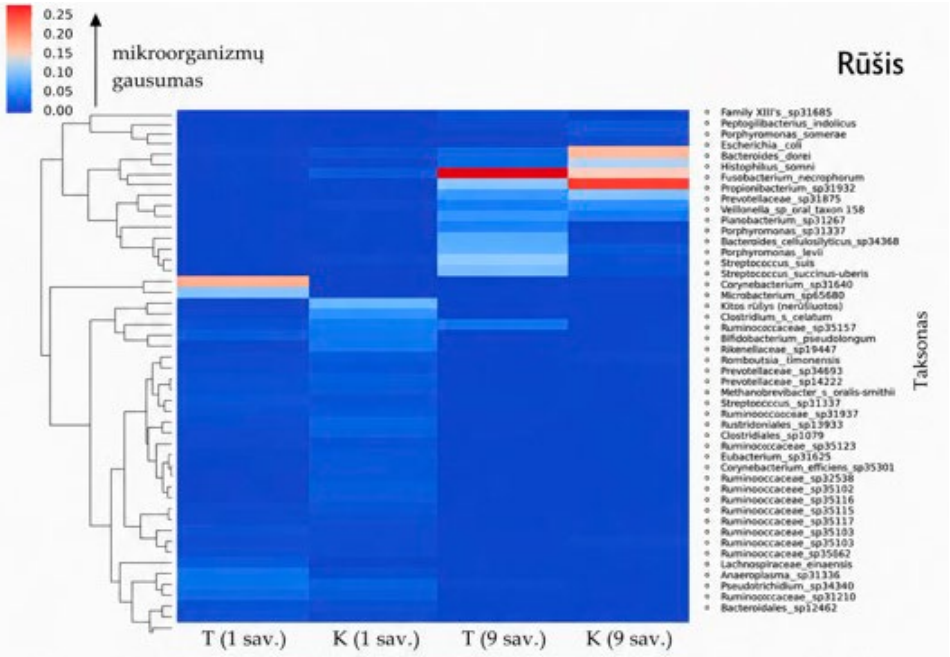
Praėjus devynioms savaitėms po veršiavimosi tiriamojoje grupėje (T (9 sav.)) dažniausiai buvo nustatomos *Fusobacteriales* ir *Bacteroidales* būrių bakterijos, o kontrolinėje grupėje (K (9 sav.)) dominavo *Fusobacteriales* būrio bakterijos.



T – tiriamoji grupė; K – kontrolinė grupė; 1 sav. – 1 savaitė po veršiavimosi; 9 sav. – 9 savaitės po veršiavimosi



T – tiriamoji grupė; K – kontrolinė grupė; 1 sav. – 1 savaitė po veršiavimosi; 9 sav. – 9 savaitės po veršiavimosi



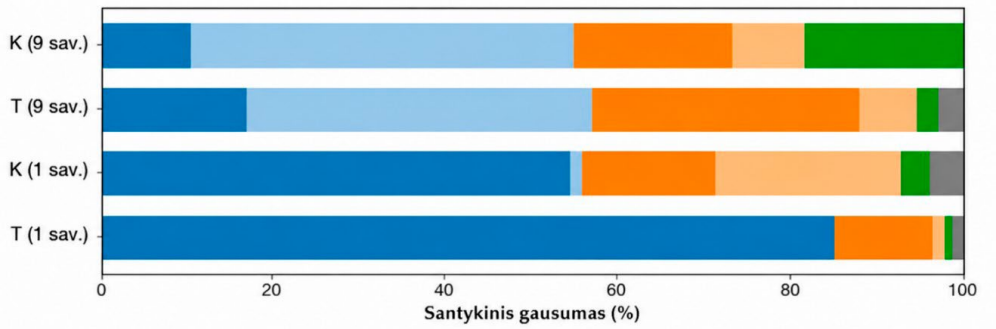
3.1.1.1 pav. *Mėsinių karvių gimdos mikrobiotos taksonominė sudėtis, atsižvelgiant į tiriamąją grupę ir mėginių ėmimo laiką po veršiavimosi*

Tiriamosios grupės mėginiai buvo paimti praėjus 1 savaitei (T (1 sav.)) ir 9 savaitėms (T (9 sav.)) po veršiavimosi, o kontrolinės grupės – tais pačiais laikotarpiais (K (1 sav.) ir K (9 sav.)). Mikrobiotos sudėtis pateikta tipų (Phylum), būrių (Order) ir rūšių (Species) taksonominiuose lygmenyse. Spalvų skalė atspindi santykinį mikroorganizmų gausumą – nuo tamsiai raudonos (didžiausias gausumas) iki tamsiai mėlynos spalvos (mažiausias gausumas). Kiekviena eilutė atitinka atskirą taksoną, kurio pavadinimas pateiktas dešinėje paveikslo pusėje. Mėginiai sugrupuoti taikant hierarchinę klasterinę analizę, pagrįstą Bray–Curtis nepanašumo indeksu. Taksonų pavadinimai, pasibaigiantys raidiniais priesagais, žymi polifiletines grupes.

Siekiant išsamiau įvertinti gimdos mikrobiotos sudėties skirtumus, taksonominė analizė buvo atlikta žemesniais taksonominiais lygmenimis. Tiriamojoje grupėje, praėjus vienai savaitei po apsiveršiavimo (T (1 sav.)), dominavo *Streptococcus* genties bakterijos, o kontrolinėje grupėje (K (1 sav.)) gausiausia buvo *Corynebacterium* gentis. Praėjus devynioms savaitėms po apsiveršiavimo, tiriamosios grupės (T (9 sav.)) gimdos mikrobiotoje vyravo *Fusobacterium* genties bakterijos, o kontrolinėje grupėje (K (9 sav.)) nustatyta didesnė *Leptotrichiaceae, Histophilus* ir *Fusobacterium* taksonų santykinė gausa.

3.1.1.1. Mėsinių karvių gimdos mikrobiotos bakterijų tipų struktūros analizė

Mėsinių karvių gimdos bakterinės mikrobiotos sudėtis tipų lygmeniu, lyginant tiriamąją ir kontrolinę grupes dviem tyrimo laikotarpiais, pateikta 3.1.1.1.1 paveiksle.



Taksonas	Iš viso	Grupės			
		T (1 sav.)	K (1 sav.)	T (9 sav.)	K (9 sav.)
Firmicutes	40.9	82.3	53.5	18.4	9.5
Fusobacteria	20.3	0.0	1.2	38.8	41.2
Bacteroidetes	19.6	11.6	15.2	30.7	20.8
Actinobacteria	9.2	1.4	19.3	6.9	9.1
Proteobacteria	6.3	0.8	2.7	2.4	19.1
Kiti taksonai	1.8	0.9	3.3	2.9	0.0

3.1.1.1.1 pav. *Mėsinių karvių gimdos mikrobiotos bakterijų tipų sudėties palyginimas tiriamosiose grupėse*

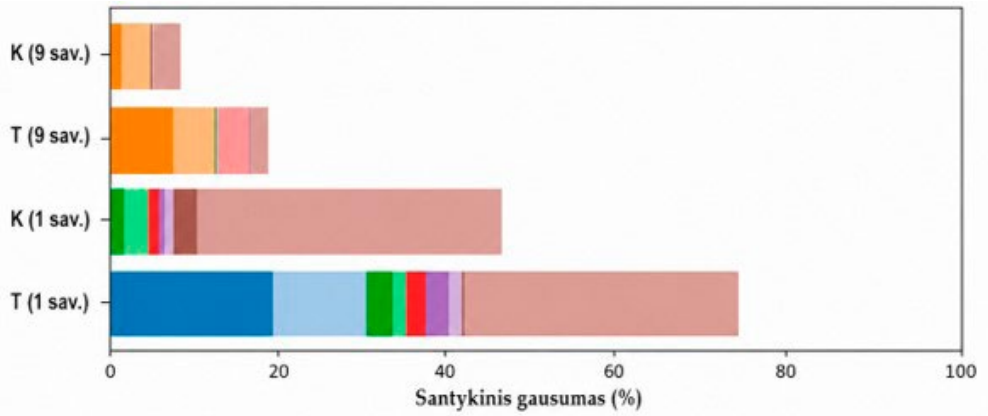
T (1 sav.) – tiriamoji grupė praėjus 1 savaitei po veršiavimosi; K (1 sav.) – kontrolinė grupė praėjus 1 savaitei po veršiavimosi; T (9 sav.) – tiriamoji grupė praėjus 9 savaitėms po veršiavimosi; K (9 sav.) – kontrolinė grupė praėjus 9 savaitėms po veršiavimosi. Pateiktos reikšmės išreiškia atskirų bakterijų tipų santykinį gausumą (%).

Paveiksle pateiktos tik tie bakterijų tipai, kurių santykinis gausumas bent vienoje tiriamojoje grupėje siekė 1 proc. arba daugiau. Lentelėje nurodytos kiekvienos bakterijų genties santykinio gausumo procentinės reikšmės.

Atlikus gimdos mikrobiotos analizę nustatyta, kad didžiausią bakterijų bendrijos dalį sudarė penki bakterijų tipai: *Firmicutes* (40,9 proc.), *Fusobacteria* (20,3 proc.), *Bacteroidetes* (19,6 proc.), *Actinobacteria* (9,2 proc.) ir *Proteobacteria* (6,3 proc.). Iš viso mėsinių karvių gimdos mikrobiotoje identifikuotos 605 bakterijų rūšys, o tai rodo didelę mikrobiotos taksonominę įvairovę visose tiriamosiose grupėse.

Dažniausiai aptinkamų rūšių, priklausančių gausiausioms bakterijų gentims, santykinė gausa pateikta 3.1.1.1.2–3.1.1.1.6 paveiksluose. Juose pa-

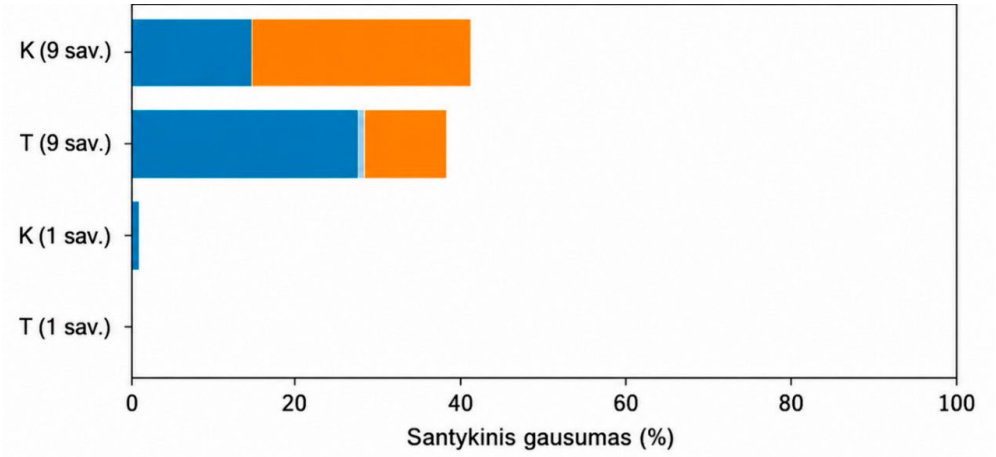
rodyta šių mikroorganizmų taksonominė priklausomybė, galima funkcinė reikšmė bei pasiskirstymas skirtingose tiriamosiose grupėse.



Taksonas	Iš viso	Grupės			
		T (1 sav.)	K (1 sav.)	T (9 sav.)	K (9 sav.)
S. Suis	4.8	19.0	0	0	0.1
S. Porcinus-uberis	2.9	11.5	0	0	0
S. Sp34368	2.2	0	0	7.5	1.4
S. Micra	2.1	0	0	4.9	3.5
S. Ilealis	1.2	3.0	1.7	0.2	0.1
S. Celatum	1.1	1.6	2.9	0.1	0
S. Sp33334	1.0	2.4	1.3	0	0.1
S. Sp31267	0.9	0	0	3.7	0
S. Sanguinis	0.9	2.9	0.6	0.1	0.1
S. Sp35107	0.7	1.6	1.1	0	0.2
S. Sp35157	0.7	0.2	2.7	0	0
S. Indolicus	0.6	0.1	0	0.5	1.7
Kiti taksonai	11.3	33.3	36.4	1.6	1.3

3.1.1.1.2 pav. *Firmicutes tipo bakterijų rūšių santykinio gausumo (proc. nuo bendros bakterijų sudėties) palyginimas mėsinių karvių gimdos mikrobiotoje*

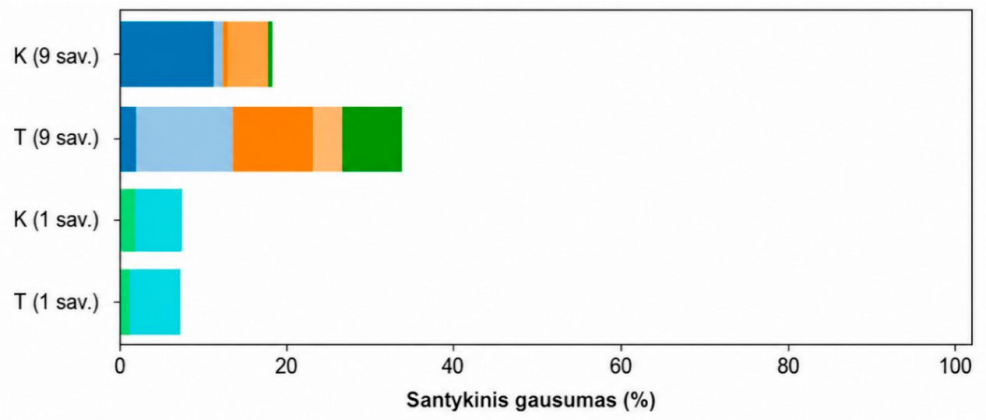
T (1 sav.) – tiriamoji grupė praėjus 1 savaitei po veršiavimosi; K (1 sav.) – kontrolinė grupė praėjus 1 savaitei po veršiavimosi; T (9 sav.) – tiriamoji grupė praėjus 9 savaitėms po veršiavimosi; K (9 sav.) – kontrolinė grupė praėjus 9 savaitėms po veršiavimosi.



Taksonas	Iš viso	Grupės			
		T (1 sav.)	K (1 sav.)	T (9 sav.)	K (9 sav.)
S. Necrophorum	11.1	0	1.2	27.9	15.4
S. Sp37444	0.2	0	0	0.7	0.1
S. sp37532	9.0	0	0	10.2	25.8

3.1.1.1.3 pav. *Fusobacteria tipo bakterijų rūšių santykinio gausumo (proc. nuo bendros bakterijų sudėties) palyginimas mėsinių karvių gimdos mikrobiotoje*

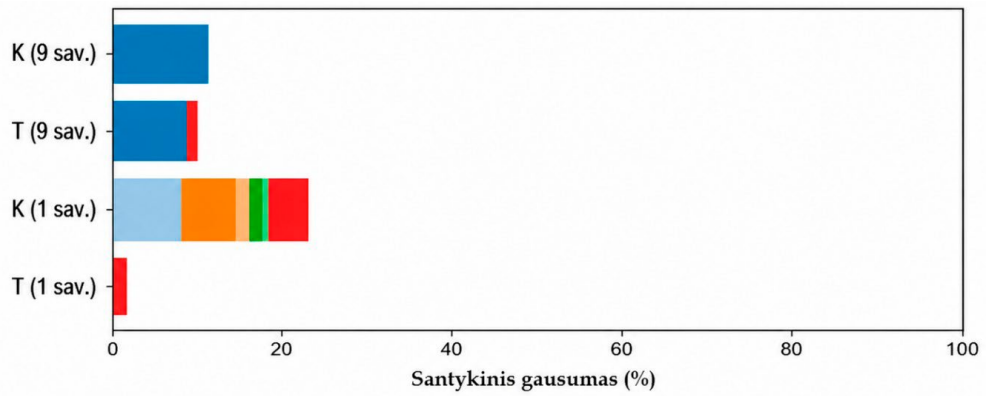
T (1 sav.) – tiriamoji grupė praėjus 1 savaitei po veršiavimosi; K (1 sav.) – kontrolinė grupė praėjus 1 savaitei po veršiavimosi; T (9 sav.) – tiriamoji grupė praėjus 9 savaitėms po veršiavimosi; K (9 sav.) – kontrolinė grupė praėjus 9 savaitėms po veršiavimosi.



Taksonas	Iš viso	Grupės			
		T (1 sav.)	K (1 sav.)	T (9 sav.)	K (9 sav.)
S. Denticanum-pyogenes	3.6	0	0	2.0	12.2
S. Sp12206	2.7	0	0.2	10.0	0.7
S. Leövi	2.3	0	0	8.5	0.5
S. Sp13875	2.1	0	0.2	3.6	4.8
S. Sp13377	1.7	0	0	6.6	0.2
S. Sp12462	0.7	1.2	1.6	0	0.1
Kiti taksonai	2.8	5.7	5.1	0	0.1

3.1.1.1.4 pav. *Bacteroidetes tipo bakterijų rūšių santykinio gausumo (proc. nuo bendros bakterijų sudėties) palyginimas mėsinių karvių gimdos mikrobiotoje*

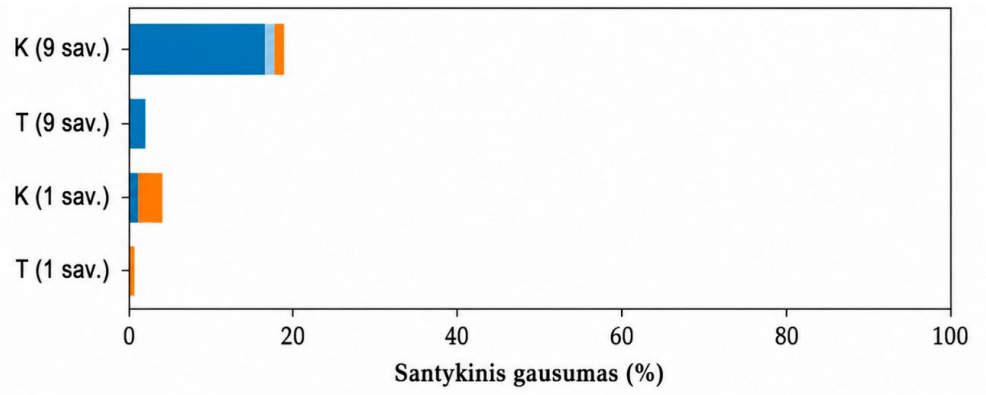
T (1 sav.) – tiriamoji grupė praėjus 1 savaitei po veršiavimosi; K (1 sav.) – kontrolinė grupė praėjus 1 savaitei po veršiavimosi; T (9 sav.) – tiriamoji grupė praėjus 9 savaitėms po veršiavimosi; K (9 sav.) – kontrolinė grupė praėjus 9 savaitėms po veršiavimosi.



Taksonas	Iš viso	Grupės			
		T (1 sav.)	K (1 sav.)	T (9 sav.)	K (9 sav.)
S. Pyogenes	3.8	0	0	6	9
S. Sp5268	1.9	0	7.6	0	0
S. Sp6940	1.2	0	4.8	0	0
S. Pseudolongum	0.4	0.4	1.2	0	0.1
S. Efficiens	0.3	0.1	1	0	0
S. Pseudotuberculosis-Ulcerans-Vitaerumini	0.2	0	0.9	0	0
Kiti taksonai	1.4	0.9	3.8	0.9	0

3.1.1.1.5 pav. *Actinobacteria tipo bakterijų rūšių santykinio gausumo (proc. nuo bendros bakterijų sudėties) palyginimas mėsinių karvių gimdos mikrobiotoje*

T (1 sav.) – tiriamoji grupė praėjus 1 savaitei po veršiavimosi; K (1 sav.) – kontrolinė grupė praėjus 1 savaitei po veršiavimosi; T (9 sav.) – tiriamoji grupė praėjus 9 savaitėms po veršiavimosi; K (9 sav.) – kontrolinė grupė praėjus 9 savaitėms po veršiavimosi.



Taksonas	Iš viso	Grupės			
		T (1 sav.)	K (1 sav.)	T (9 sav.)	K (9 sav.)
S. Somni	5.2	0.1	0.9	2.2	17.8
S. coli	0.3	0.1	0.1	0	0.9
Kiti taksonai	0.4	0.4	1.6	0.1	0.4

3.1.1.1.6 pav. *Proteobacteria tipo bakterijų rūšių santykinio gausumo (proc. nuo bendros bakterijų sudėties) palyginimas mėsinių karvių gimdos mikrobiotoje*

T (1 sav.) – tiriamoji grupė praėjus 1 savaitei po veršiavimosi; K (1 sav.) – kontrolinė grupė praėjus 1 savaitei po veršiavimosi; T (9 sav.) – tiriamoji grupė praėjus 9 savaitėms po veršiavimosi; K (9 sav.) – kontrolinė grupė praėjus 9 savaitėms po veršiavimosi.

Atlikus *Firmicutes* tipo bakterijų rūšių analizę nustatyti ryškūs jų sudėties skirtumai tarp tiriamųjų grupių (3.1.1.1.2 pav.). T (1 sav.) grupėje dominavo *Streptococcus suis* (19,0 proc.) ir *Streptococcus porcinus–uberis* (11,5 proc.), kurių santykinis gausumas kitose grupėse buvo labai mažas arba šių rūšių nenustatyta.

K (1 sav.) grupėje didžiausiu santykiniu gausumu pasižymėjo *Clostridium celatum* (2,9 proc.), *Lactobacillus ilealis* (1,7 proc.) bei kelios neidentifikuotos *Clostridiales* būrio rūšys (*Sp33334* ir *Sp35107*). Tuo tarpu T (9 sav.) ir K (9 sav.) grupėse *Firmicutes* tipo bakterijų buvo nustatyta gerokai mažiau – aptikti tik pavieniai *L. ilealis*, *C. sanguinis* ir kitų taksonų atstovai, kurių santykinis gausumas siekė 0,1–0,2 proc.

Fusobacteria tipo bakterijų analizė parodė nevienodą jų pasiskirstymą tarp tiriamųjų grupių (3.1.1.1.3 pav). T (9 sav.) ir K (9 sav.) grupėse dominavo *Fusobacterium necrophorum*, sudaręs atitinkamai 27,9 proc. ir 15,4 proc. visos mikrobiotos. Taip pat dideliu santykiniu gausumu pasižymėjo *Fusobacterium*

sp37532, kuris sudarė 10,2 proc. T (9 sav.) ir 25,8 proc. K (9 sav.) grupių mikrobiotos. *Fusobacterium sp37444* buvo nustatyta tik nedideliais kiekiais (iki 0,7 proc.) T (9 sav.) grupėje, o T (1 sav.) ir K (1 sav.) grupėse *Fusobacteria* tipo bakterijų beveik nenustatyta.

Įvertinus *Bacteroidetes* tipo bakterijų pasiskirstymą nustatyta, kad jos buvo aptiktos tik T (9 sav.) ir K (9 sav.) grupėse (3.1.1.1.4 pav.*),* o T (1 sav.) ir K (1 sav.) grupėse jų nenustatyta arba jų kiekis buvo mažesnis už aptikimo ribą. K (9 sav.) grupėje dominavo *Bacteroides denticanum–pyogenes*, sudaręs 12,2 proc. visos mikrobiotos. Be šios rūšies, nustatyti *Sp13875* (4,8 proc.), *Sp12206* (0,7 proc.) ir *Bacteroides levii* (0,5 proc.). T (9 sav.) grupėje gausiausios buvo *Sp12206* (10,0 proc.), *Bacteroides levii* (8,5 proc.) ir *Sp13875* (3,6 proc.).

Actinobacteria tipo bakterijų analizė parodė skirtingą jų sudėtį tarp tiriamųjų grupių (3.1.1.1.5 pav.). K (1 sav.) grupėje didžiausiu santykiniu gausumu pasižymėjo dvi neidentifikuotos rūšys – *Sp5268* (7,6 proc.) ir *Sp6940* (4,8 proc.), taip pat *Bifidobacterium pseudolongum* (1,2 proc.) bei *Bifidobacterium efficiens* (1,0 proc.). T (9 sav.) ir K (9 sav.) grupėse dominavo *Trueperella pyogenes*, sudariusi atitinkamai 6,0 proc. ir 9,0 proc. visos mikrobiotos. T (1 sav.) grupėje *Actinobacteria* tipo bakterijų nustatyta labai nedaug – aptikta tik *B. pseudolongum* (0,4 proc.) ir *B. efficiens* (0,1 proc.).

Proteobacteria tipo bakterijų pasiskirstymas pateiktas 3.1.1.1.6 paveiksle. Didžiausias šio tipo bakterijų santykinis gausumas nustatytas K (9 sav.) grupėje, kur dominavo *Histophilus somni*, sudaręs 17,8 proc. visos mikrobiotos. T (9 sav.), K (1 sav.) ir T (1 sav.) grupėse šios rūšies santykinis gausumas buvo gerokai mažesnis ir siekė atitinkamai 2,2 proc., 0,9 proc. ir 0,1 proc. *Escherichia coli* nustatyta visose tiriamosiose grupėse, tačiau jos santykinis gausumas buvo nedidelis (0,0–0,9 proc.).

3.1.2. Mėsinių karvių gimdos mikrobiotos grybinė sudėtis

Mėsinių karvių gimdos mikrobiotos grybų sudėtis tipų (*Phylum*), būrių (*Order*) ir rūšių (*Species*) taksonominiuose lygmenyse pateikta 3.1.2.1 paveiksle.

Šiluminio žemėlapio analizė būrių lygmeniu parodė, kad grybų bendrijos sudėtis skyrėsi tarp tiriamųjų grupių. Didžiausiu santykiniu gausumu pasižymėjo *Saccharomycetales* būrio grybai, ypač K (1 sav.) grupėje, kur jų santykinis gausumas buvo didžiausias. T (9 sav.) grupėje šio būrio grybų nustatyta mažiau, o K (9 sav.) grupėje jų aptikta tik nedideliais kiekiais.

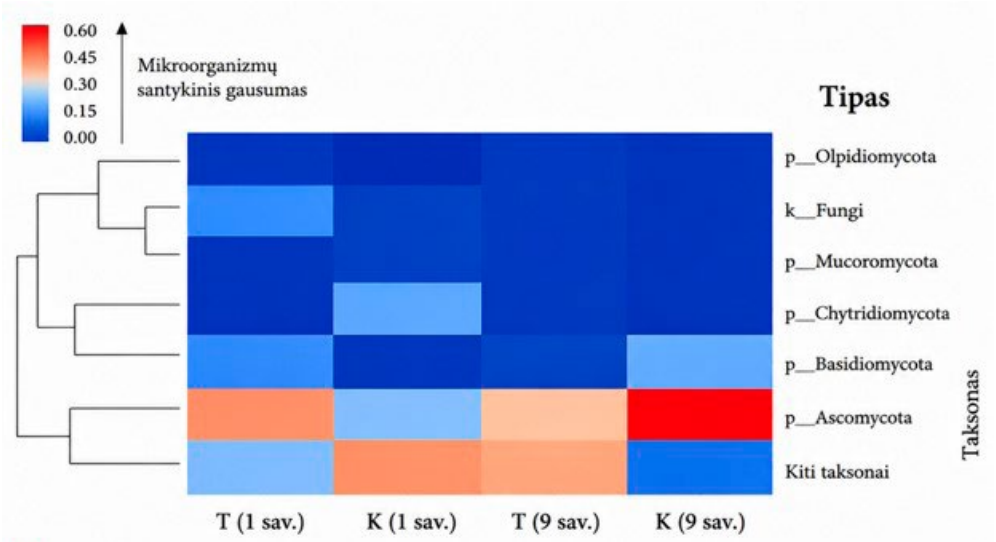
T (1 sav.) grupėje daugumos grybų taksonų santykinis gausumas buvo nedidelis, tačiau nustatyti pavieniai *Microascales*, *Sordariales* ir *Eurotiales* bū-

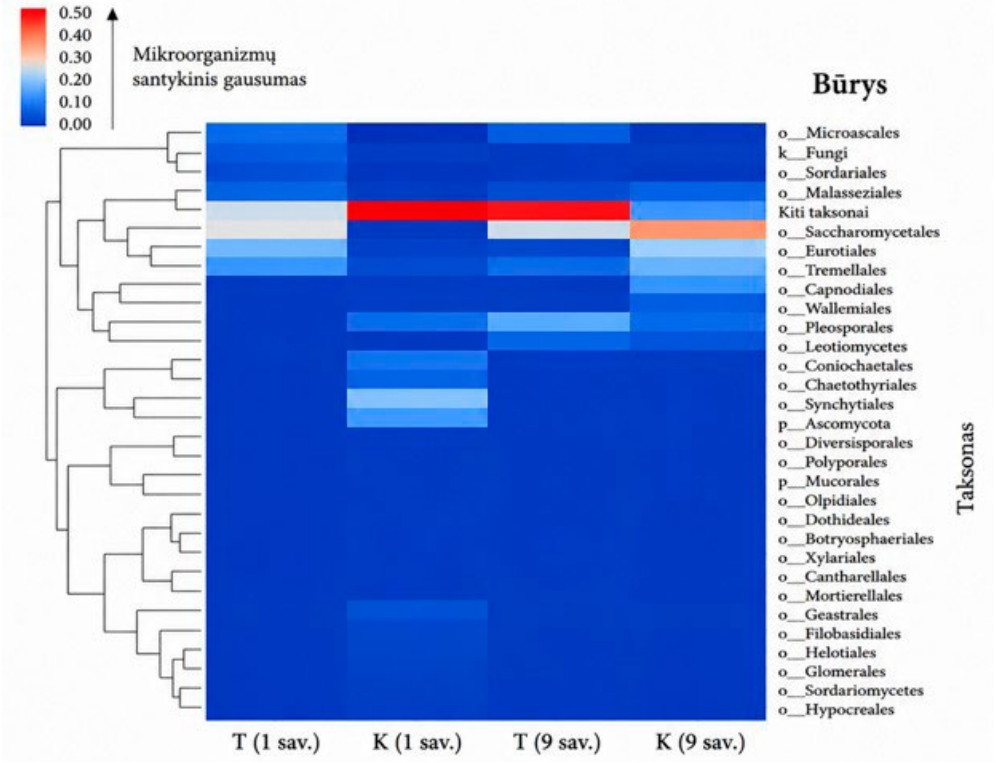
rių atstovai. K (9 sav.) grupėje grybų bendrija pasižymėjo nedideliu taksonų gausumu, o ryškaus kurio nors būrio dominavimo nenustatyta.

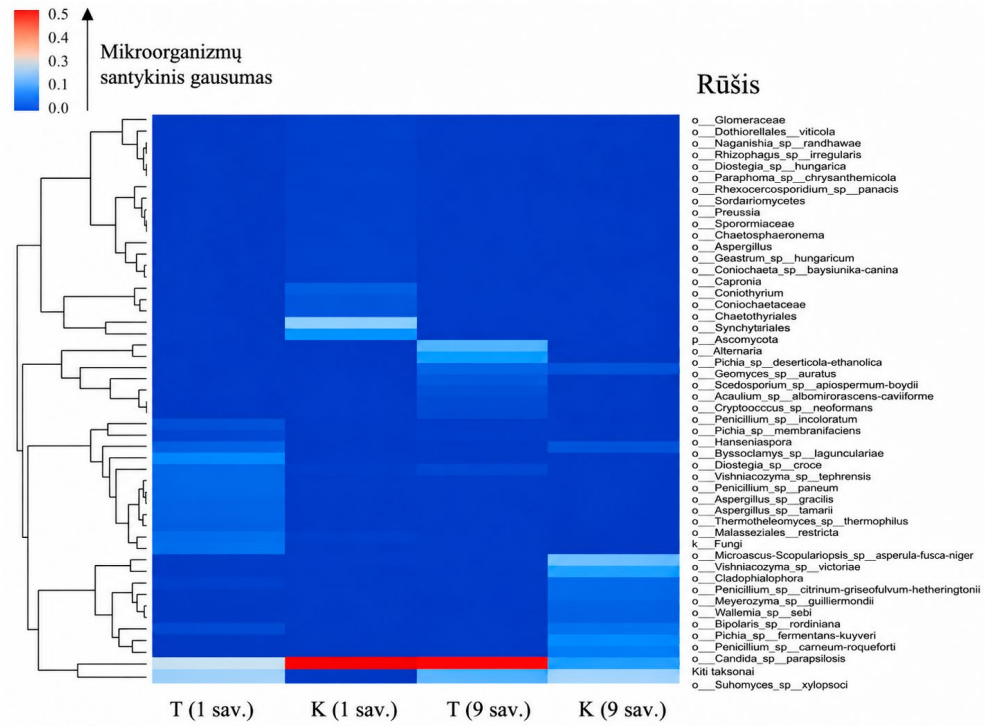
Be *Saccharomycetales*, T (1 sav.) ir T (9 sav.) grupėse taip pat aptikta *Eurotiales*, *Tremellales* ir *Sordariales* būrių grybų, kurių santykinis gausumas buvo mažas arba vidutinis. Nedideliais kiekiais visose tiriamosiose grupėse nustatyti ir *Malasseziales* bei *Capnodiales* būrių atstovai.

„Kiti“ kategorijai priskirti taksonai tarp tiriamųjų grupių taip pat skyrėsi, rodydami mažesnio santykinio gausumo arba nevisiškai identifikuotų grybų taksonų buvimą gimdos mikobiotoje.

Grybų tipų lygmens analizė parodė skirtingą mikobiotos sudėtį tarp tiriamųjų grupių. Iš viso identifikuoti 83 grybų taksonai, kurių santykinis gausumas grupėse buvo nevienodas. Visose tiriamosiose grupėse dominavo *Ascomycota* tipui priskiriami grybai. Didžiausias jų santykinis gausumas nustatytas K (9 sav.) grupėje, mažesnis – T (9 sav.) ir K (1 sav.) grupėse, o mažiausias – T (1 sav.) grupėje.


0.60
0.45
0.30
0.15
0.00
Mikroorganizmų
santykinis gausumas
Tipas
p__Olpidiomycota
k__Fungi
p__Mucoromycota
p__Chytridiomycota
p__Basidiomycota
p__Ascomycota
Kiti taksonai
Taksonas
T (1 sav.)
K (1 sav.)
T (9 sav.)
K (9 sav.)


0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
Mikroorganizmų
santykinis gausumas
Būrys
o__Microascales
k__Fungi
o__Sordariales
o__Malasseziales
Kiti taksonai
o__Saccharomycetales
o__Eurotiales
o__Tremellales
o__Capnodiales
o__Wallemiales
o__Pleosporales
o__Leotiomycetes
o__Coniochaetales
o__Chaetothyriales
o__Synchytiales
p__Ascomycota
o__Diversisporales
o__Polyporales
p__Mucorales
o__Olpidiales
o__Dothideales
o__Botryosphaeriales
o__Xylariales
o__Cantharellales
o__Mortierellales
o__Geastrales
o__Filobasidiales
o__Helotiales
o__Glomerales
o__Sordariomycetes
o__Hypocreales
Taksonas
T (1 sav.)
K (1 sav.)
T (9 sav.)
K (9 sav.)



3.1.2.1 pav. *Mėsinių karvių gimdos mikobiotos grybų sudėtis pagal tiriamąją grupę ir mėginių paėmimo laiką po veršiavimosi (T (1 sav.), K (1 sav.), T (9 sav.) ir K (9 sav.))*

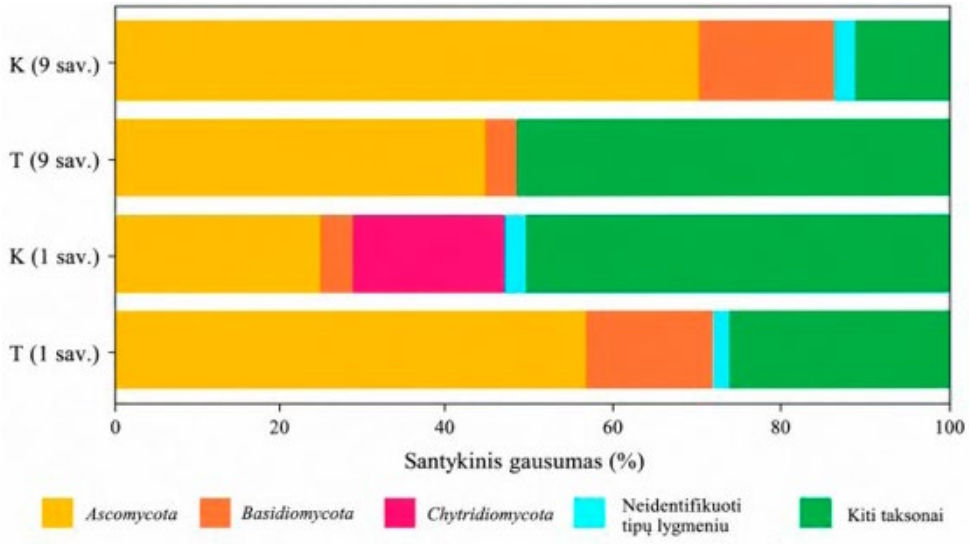
Mikobiotos sudėtis pateikta tipų (Phylum), būrių (Order), genčių (Genus) ir rūšių (Species) taksonominiuose lygmenyse. Spalvų intensyvumas atspindi santykinį gausumą – nuo tamsiai raudonos (didžiausias) iki tamsiai mėlynos spalvos (mažiausias). Kiekviena eilutė atitinka atskirą taksoną, kurio pavadinimas pateiktas dešinėje paveikslo pusėje. Mėginiai sugrupuoti taikant hierarchinę klasterinę analizę, pagrįstą Bray–Curtis nepanašumo indeksu. Taksonų pavadinimai, pasibaigiantys raidinėmis priesagomis, žymi polifiletines grupes.

3.1.2.1. Mėsinių karvių gimdos mikobiotos taksonominės sudėties analizė

Visose tiriamosiose grupėse dominavo *Ascomycota* tipo grybai. Be *Ascomycota,* visose grupėse buvo nustatyti ir *Basidiomycota* tipo grybai, kurių didžiausias santykinis gausumas nustatytas K (9 sav.) grupėje. *Chytridiomycota* tipo grybų didžiausias santykinis gausumas nustatytas K (1 sav.) grupėje (3.1.2.1.1 pav.).

„Kitų taksonų“ kategorijos santykinis gausumas buvo didžiausias K (1 sav.) ir T (9 sav.) grupėse – atitinkamai 51,6 proc. ir 50,3 proc. T (1 sav.) grupėje šios kategorijos santykinis gausumas siekė 23,8 proc., o K (9 sav.) grupėje – 10,1 proc.

Apibendrinus gautus duomenis nustatyta, kad mėsinių karvių gimdos mikobiotoje dominavo trys grybų tipai: *Ascomycota* (49,4 %), *Basidiomycota* (10,3 %) ir *Chytridiomycota* (4,6 %), kurie kartu sudarė 64,3 % bendros mikobiotos. Likusią dalį (33,9 %) sudarė taksonai, kurie tipų lygmeniu nebuvo priskirti konkrečiam grybų tipui ir analizės rezultatuose buvo pateikti „Other“ kategorijoje.



Taksonas	Iš viso (%)	Grupės (%)			
		T (1 sav.)	K (1 sav.)	T (9 sav.)	K (9 sav.)
Ascomycota	49,4	54,5	25,6	46,1	71,6
Basidiomycota	10,3	16,4	2,8	3,6	18,3
Chytridiomycota	4,6	0,0	18,6	0,0	0,0
Neidentifikuoti tipų lygmeniu	1,5	5,3	0,8	0,0	0,0
Kiti taksonai	33,9	23,8	51,6	50,3	10,1

3.1.2.1.1 pav. *Mėsinių karvių gimdos mikobiotos grybų genčių santykinio gausumo palyginimas tiriamosiose grupėse*

Paveiksle pateiktos tik tos grybų gentys, kurių santykinis gausumas bent vienoje tiriamojoje grupėje siekė 1 proc. arba daugiau. Lentelėje pateiktos kiekvienos grybų genties santykinio gausumo procentinės reikšmės. T (1 sav.) – tiriamoji grupė praėjus 1 savaitei po veršiavimosi; K (1 sav.) – kontrolinė grupė praėjus 1 savaitei po veršiavimosi; T (9 sav.) – tiriamoji grupė praėjus 9 savaitėms po veršiavimosi; K (9 sav.) – kontrolinė grupė praėjus 9 savaitėms po veršiavimosi.

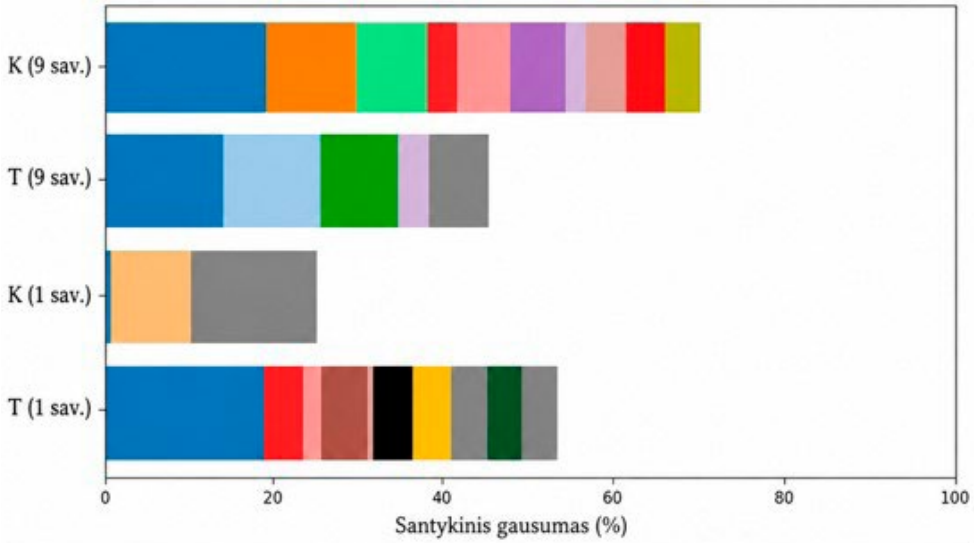
T (1 sav.) grupėje didesniu santykiniu gausumu pasižymėjo *Suhomyces xylopsoci* (19,2 proc.), *Aspergillus asperula–fusca–niger* (5,5 proc.), *Penicil-*

lium paneum (4,8 proc.), *Aspergillus gracilis* (4,5 proc.), *Aspergillus tamarii* (4,4 proc.) ir *Aspergillus thermophilus* (4,2 proc.) (3.1.2.1.2 pav.).

K (1 sav.) grupėje didžiausias santykinis gausumas nustatytas neidentifikuotam taksonui (9,5 proc.), taip pat *Pichia deserticola–ethanolica* (9,3 proc.), *Penicillium carneum–roqueforti* (8,6 proc.) ir *Pichia fermentans–kluyveri* (6,2 proc.).

T (9 sav.) grupėje didžiausiu santykiniu gausumu pasižymėjo *Suhomyces xylopsoci* (14,2 proc.). Taip pat nustatytos *Scedosporium apiospermum–boydii* (3,0 proc.), *Scedosporium albonigrescens–caviariforme* (1,8 proc.) ir *Penicillium incoloratum* (1,6 proc.) rūšys.

K (9 sav.) grupėje didžiausiu santykiniu gausumu pasižymėjo *Suhomyces xylopsoci* (19,2 proc.) ir neidentifikuotas taksonas (11,0 proc.). Taip pat nustatytos *Candida parapsilosis* (6,7 proc.), *Candida guilliermondii* (4,9 proc.), *Penicillium citrinum–griseofulvum–hetheringtonii* (4,7 proc.) ir *Pichia membranifaciens* (2,7 proc.).



Taksonas	Iš viso	Grupės			
		T (1 sav.)	K (1 sav.)	T (9 sav.)	K (9 sav.)
S. Xylopsoci	13,2	19,2	0,4	14,2	19,2
S. neidentifikuota rūšis 1	2,9	0	0	11,8	0
S. neidentifikuota rūšis 2	2,8	0	0,2	0	11,0
S. neidentifikuota rūšis 3	2,4	0	9,5	0	0
S. Deserticola-ethanolica	2,3	0	0	9,3	0
S. Carneum-roqueforti	2,1	0	0	0	8,6
S. Laguncullariae	2,1	4,7	0	0	3,6
S. Fermentans-kluyveri	2,1	2,1	0	0	6,2
S. Parapsilosis	1,7	0	0	0	6,7
S. Auratus	1,5	0	0	3,7	2,5
S. Asperula-fusca-niger	1,4	5,5	0	0	0
S. Citrinum-griseofulvum-hetheringtonii	1,3	0,7	0	0	4,7
S. Paneum	1,2	4,8	0	0	0
S. Guilliemondii	1,2	0	0	0	4,9
S. Gracilis	1,1	4,5	0	0	0
S. Tamarii	1,1	4,4	0	0	0
S. Sorokiniana	1,0	0	0	0	4,0
S. Thermophilus	1,0	4,2	0	0	0
Kitos rūšys	6,3	4,4	15,4	7,2	0,2

3.1.2.1.2 pav. *Ascomycota tipo grybų rūšių santykinio gausumo (% nuo bendros grybų sudėties) palyginimas mėsinių karvių gimdos mikobiotoje*

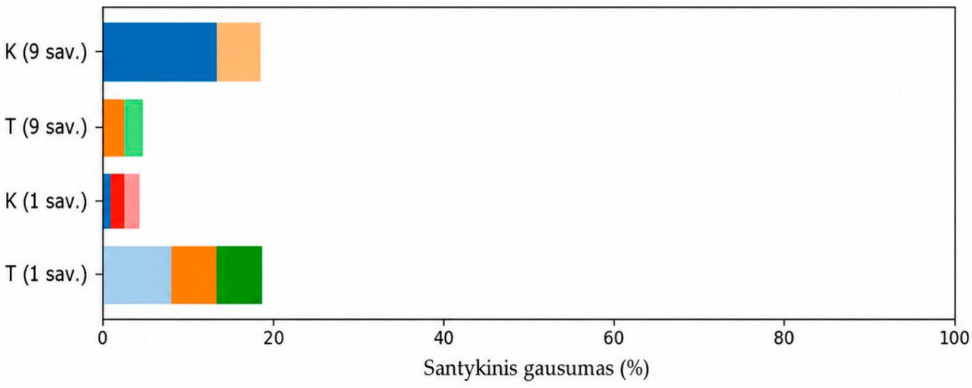
T (1 sav.) – tiriamoji grupė praėjus 1 savaitei po veršiavimosi; K (1 sav.) – kontrolinė grupė praėjus 1 savaitei po veršiavimosi; T (9 sav.) – tiriamoji grupė praėjus 9 savaitėms po veršiavimosi; K (9 sav.) – kontrolinė grupė praėjus 9 savaitėms po veršiavimosi.

K (9 sav.) grupėje dominavo *Vishniacozyma victoriae*, kurios santykinis gausumas sudarė 14,0 proc. visos grybų bendrijos. Tik šioje grupėje nustatyta ir *Vishniacozyma sebi*, kurios santykinis gausumas siekė 4,3 proc. (3.1.2.1.3 pav.)

T (1 sav.) grupėje didžiausiu santykiniu gausumu pasižymėjo *Vishniacozyma crocea* (8,0 proc.), *Vishniacozyma tephrensis* (4,5 proc.) ir *Malassezia restricta* (3,8 proc.).

T (9 sav.) grupėje dažniausiai aptiktos *Vishniacozyma tephrensis* (2,0 %) ir *Cryptococcus neoformans* (1,6 proc.) rūšys.

K (1 sav.) grupėje nustatyta nedaug *Basidiomycota* tipo grybų. Dažniausiai aptiktos *Rhodotorula hungarica* (0,9 proc.), *Vishniacozyma victoriae* (0,5 proc.) ir *Vishniacozyma tephrensis* (0,4 proc.) rūšys.



Taksonas	Iš viso	Grupės			
		T (1 sav.)	K (1 sav.)	T (9 sav.)	K (9 sav.)
Vishniacozyma victoriae	3,6	0	0,5	0	14,0
Vishniacozyma crocea	2,0	8,0	0	0	0
Vishniacozyma tephrensis	1,7	4,5	0,4	2,0	0
Vishniacozyma sebi	1,1	0	0	0	4,3
Malassezia restricta	1,0	3,8	0	0	0
Cryptococcus neoformans	0,4	0	0	1,6	0
Rhodotorula hungarica	0,2	0	0,9	0	0
Kitos rūšys	0,2	0	0,9	0	0

3.1.2.1.3 pav. *Basidiomycota tipo grybų rūšių santykinio gausumo (proc. nuo bendros grybų sudėties) palyginimas mėsinių karvių gimdos mikobiotoje*

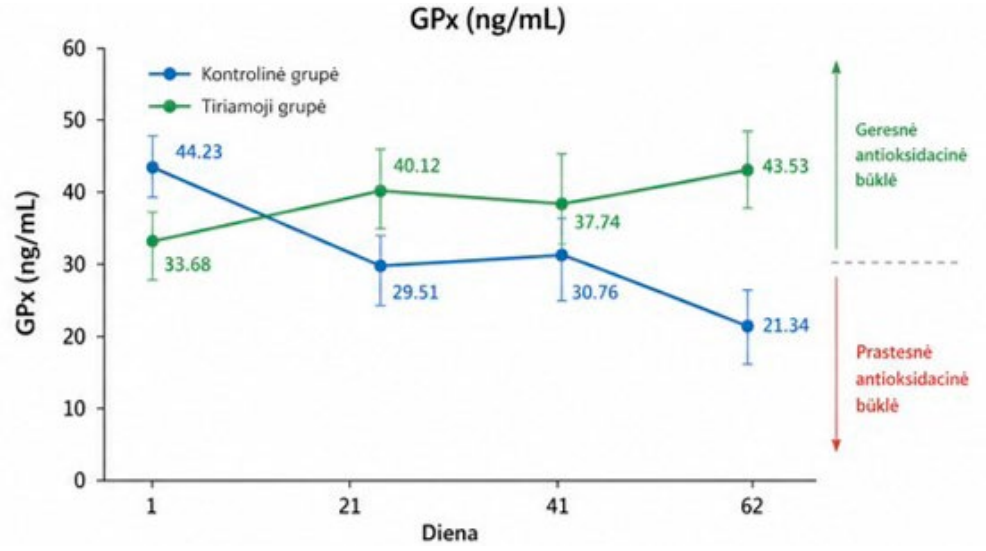
T (1 sav.) – tiriamoji grupė praėjus 1 savaitei po veršiavimosi; K (1 sav.) – kontrolinė grupė praėjus 1 savaitei po veršiavimosi; T (9 sav.) – tiriamoji grupė praėjus 9 savaitėms po veršiavimosi; K (9 sav.) – kontrolinė grupė praėjus 9 savaitėms po veršiavimosi.

3.2. Oksidacinio streso žymenų tyrimo rezultatai

3.2.1. GPx (glutationo peroksidazės) tyrimo rezultatai

Glutationo peroksidazės (GPx) koncentracijos dinamika tiriamojoje ir kontrolinėje grupėse tyrimo metu pateikta 3.2.1.1 paveiksle. Kontrolinėje grupėje GPx koncentracija viso tyrimo metu nuosekliai mažėjo – nuo 44,23 ± 16,09 ng/ml pirmąją tyrimo dieną iki 21,34 ± 18,28 ng/ml 62–ąją dieną. Tuo tarpu tiriamojoje grupėje po pradinės 33,68 ± 24,31 ng/ml koncentracijos buvo stebimas padidėjimas iki 40,12 ± 27,16 ng/ml 21 dieną, nedidelis sumažėjimas iki 37,74 ± 19,66 ng/ml 41 dieną ir pakartotinis padidėjimas iki 43,53 ± 22,36 ng/ml tyrimo pabaigoje.

Siekiant įvertinti grupės, tyrimo dienos ir jų sąveikos poveikį GPx koncentracijai, buvo taikytas tiesinis mišrusis modelis (Linear Mixed Model, LMM). Analizė parodė, kad grupės efektas nebuvo statistiškai reikšmingas ($F = 0,295$; $p = 0,600$). Taip pat nenustatytas statistiškai reikšmingas tyrimo dienos efektas ($F = 0,631$; $p = 0,602$) bei grupės ir tyrimo dienos sąveikos efektas ($F = 1,354$; $p = 0,281$).



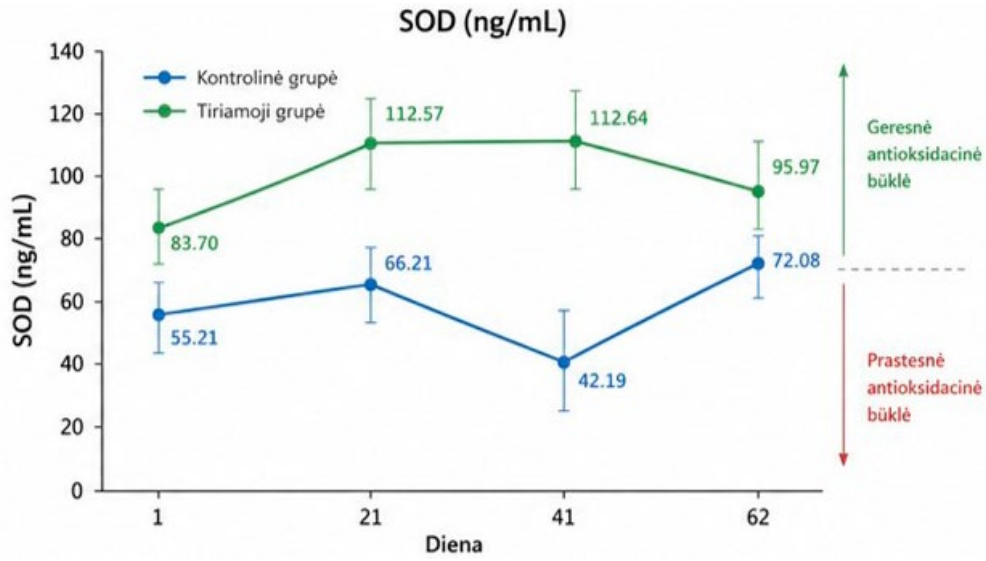
3.2.1.1 pav. *Glutationo peroksidazės (GPx) koncentracijos dinamika*

3.2.2. Superoksido dismutazės (SOD) tyrimo rezultatai

Superoksido dismutazės (SOD) koncentracijos pokyčiai tyrimo laikotarpiu kontrolinėje ir tiriamojoje grupėse pateikti 3.2.2.1 paveiksle. Nustatyta, kad viso tyrimo metu SOD koncentracijos tiriamojoje grupėje buvo didesnės

nei kontrolinėje. Tyrimo pradžioje SOD koncentracija kontrolinėje grupėje siekė 55,21 ± 49,34 ng/ml, o tiriamojoje – 83,70 ± 46,32 ng/ml. Didžiausios reikšmės tiriamojoje grupėje nustatytos 21 ir 41 tyrimo dienomis (112,57 ± 108,26 ng/ml ir 112,64 ± 127,39 ng/ml), o tyrimo pabaigoje koncentracija išliko padidėjusi (95,97 ± 45,50 ng/ml). Dideli standartiniai nuokrypiai rodo ryškų individualų tiriamųjų atsako kintamumą.

Siekiant įvertinti grupės, tyrimo dienos ir jų sąveikos poveikį SOD koncentracijai, buvo taikytas tiesinis mišrusis modelis (Linear Mixed Model, LMM). Statistiškai reikšmingo grupės efekto nenustatyta (F = 2,688; p = 0,120). Taip pat nenustatytas statistiškai reikšmingas tyrimo dienos efektas (F = 0,237; p = 0,870) ir grupės bei tyrimo dienos sąveikos efektas (F = 0,322; p = 0,809).



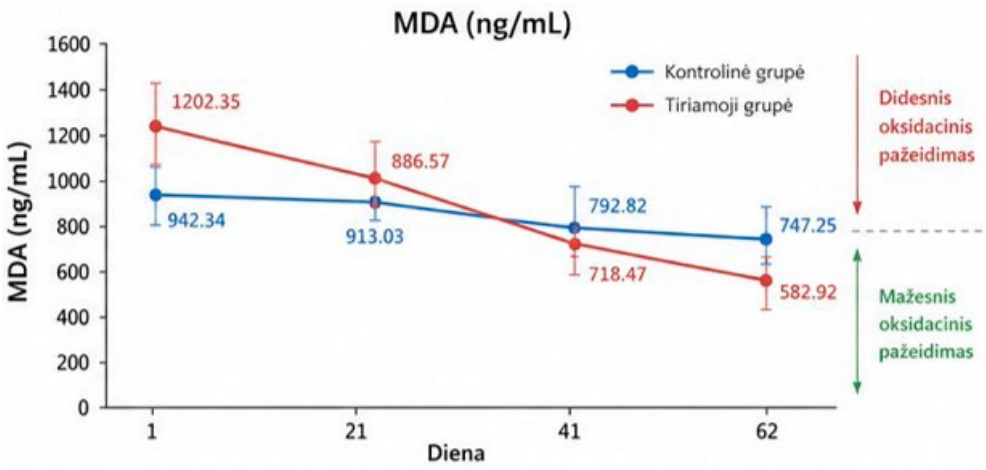
3.2.2.1 pav. *Superoksido dismutazės (SOD) koncentracijos dinamika*

3.2.3. Malondialdehido MDA tyrimo rezultatai

Malondialdehido (MDA) koncentracijos pokyčiai tyrimo laikotarpiu kontrolinėje ir tiriamojoje grupėse pateikti 3.2.3.1 paveiksle. Tyrimo metu MDA koncentracija mažėjo abiejose grupėse. Kontrolinėje grupėje MDA koncentracija sumažėjo nuo 942,34 ± 362,24 ng/ml iki 747,25 ± 263,99 ng/ml, o tiriamojoje grupėje – nuo 1202,35 ± 609,48 ng/ml iki 582,92 ± 212,68 ng/ml.

Siekiant įvertinti grupės, tyrimo dienos ir jų sąveikos poveikį MDA koncentracijai, buvo taikytas tiesinis mišrusis modelis (Linear Mixed Model, LMM). Grupės efektas nebuvo statistiškai reikšmingas (F < 0,001; p = 0,992). Nustatytas statistiškai reikšmingas tyrimo dienos efektas (F = 3,167;

p = 0,043), tačiau grupės ir tyrimo dienos sąveikos efektas nebuvo statistiškai reikšmingas (F = 0,939; p = 0,437).



3.2.3.1 pav. *Malondialdehido (MDA) koncentracijos dinamika*

3.3. Laikotarpio iki pirmosios rujos analizė

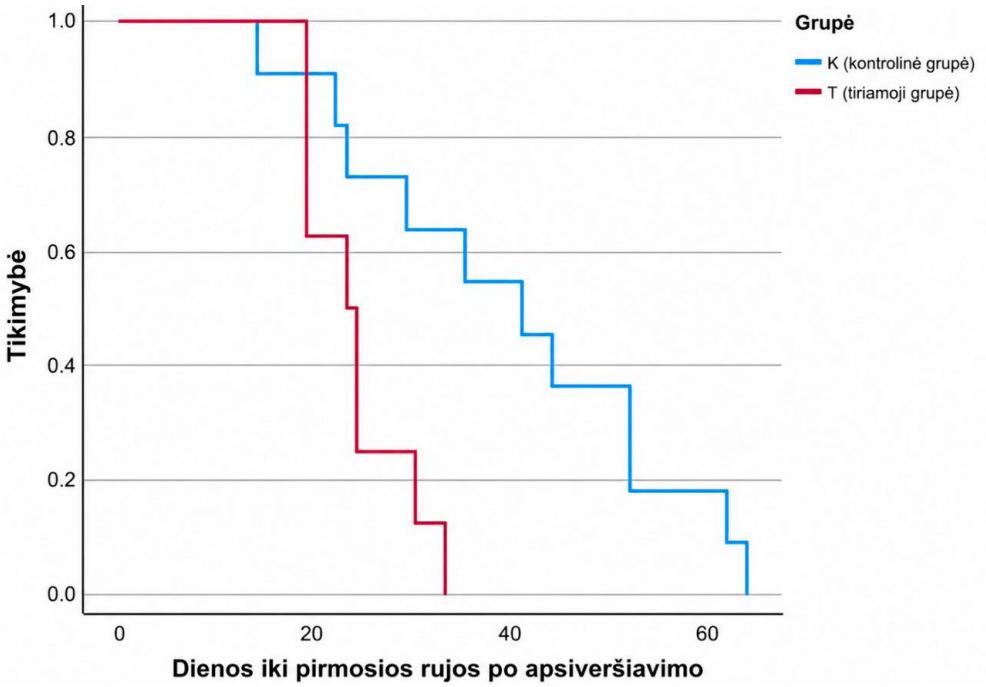
Nustatyta, kad vynuogių ekstrakto boliusų naudojimas turėjo statistiškai reikšmingą poveikį laikotarpiui iki pirmosios rujos po apsiveršiavimo ($F_{1,17}$ = 4,56; *p* = 0,048; dalinis η^2 = 0,21) (3.3.1 lentelė).

3.3.1 lentelė. *Vynuogių ekstrakto boliusų naudojimo sąsajos su fiziologiniais ir reprodukciniais rodikliais*

Parametras	Modelis	Grupė (*p*)	Sąveika (*p*)	Efekto dydis (η^2)
Dienų skaičius iki pirmosios rujos	GLM	0.048	—	0.21
Estradiolis	LMM	0.437	0.767	—
Progesteronas	GLM	0.893	—	—
Rujos indeksas	LMM	0.117	0.050	—
Vidutinė temperatūra (7 d)	GLM	0.531	—	—
Aktyvumas	GLM	0.367	—	—
Prieskrandžio temperatūra	LMM	0.231	0.362	—
Akies temperatura	GLM	0.685	—	—
Vulvos temperatūra 3C	GLM	0.176	—	0.147
Vulvos temperatūra 2C	LMM	0.498	0.522	—
Vulvos temperatūra 1C	LMM	0.673	0.917	—

Pastaba. LMM – mišriųjų efektų tiesinis modelis; GLM – bendrasis tiesinis modelis; η^2 – dalinis eta kvadratas. Statistiškai reikšmingu laikytas skirtumas, kai p < 0,05.

Kaplan–Mejer analizė parodė statistiškai reikšmingus skirtumus tarp kontrolinės (C) ir tiriamosios (T) grupių pagal laiką iki pirmosios rujos po apsiveršiavimo (3.3.1 pav.). Tiriamosios grupės karvėms pirmoji ruja pasireiškė anksčiau nei kontrolinės grupės gyvuliams. Skirtumai tarp grupių buvo įvertinti taikant Log–rank (Mantel–Cox) kriterijų.



3.3.1 pav. *Laikotarpio iki pirmosios rujos po apsiveršiavimo Kaplan–Mejer kreivės kontrolinėje (C) ir tiriamojoje (T) grupėse*

Vidutinis laikotarpis nuo veršiavimosi iki pirmosios rujos tiriamojoje grupėje buvo 23,88 ± 1,86 dienos, o kontrolinėje grupėje – 39,82 ± 5,05 dienos. Mediana atitinkamai siekė 23,0 dienas (95 proc. PI: 18,38–27,62) ir 41,0 dieną (95 proc. PI: 24,82–57,18).

Log–rank (Mantel–Cox) testas patvirtino statistiškai reikšmingą skirtumą tarp grupių ($\chi^2 = 6,642$; $p = 0,010$), rodantį, kad vynuogių ekstrakto boliusus gavusios karvės po veršiavimosi rują pasiekė reikšmingai anksčiau.

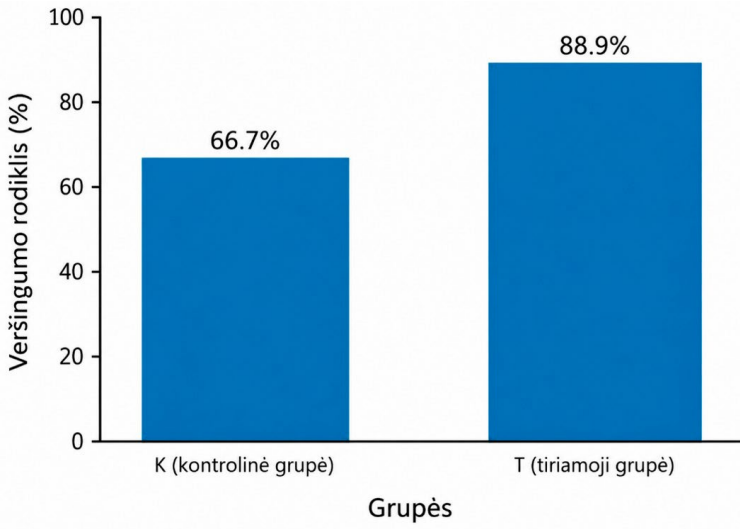
3.4. Vynuogių ekstrakto papildo poveikis reprodukciniams rodikliams

Vertinant vynuogių ekstrakto papildo poveikį nustatyta, kad papildų naudojimas neturėjo statistiškai reikšmingos įtakos didžiojo prieskrandžio temperatūrai, gyvulių aktyvumui, akies bei vulvos paviršiaus temperatūrai, taip pat estradiolio ir progesterono koncentracijoms kraujo serume ($p > 0,05$).

Rujos indeksui nustatyta grupės ir reprodukcinio laikotarpio sąveikos įtaka, pasiekusi statistinio reikšmingumo ribą (p = 0,050), rodanti galimą vynuogių ekstrakto papildymo įtaką šio rodiklio pokyčiams.

3.5. Veršingumo rodiklio rezultatai

Tiriamosios grupės karvių veršingumo rodiklis buvo didesnis (88,9 proc.) nei kontrolinės grupės (66,7 proc.; 3.5.1 pav.). Nors skirtumas tarp grupių buvo gana ryškus, dėl nedidelės tiriamųjų galvijų imties statistinis reikšmingumas nenustatytas.



3.5.1 pav. *Veršingumo rodiklio palyginimas kontrolinėje (C) ir tiriamojoje (T) grupėse*

3.6. Koreliacinė analizė

Atlikus Benjamini–Hochberg klaidingų atradimų dažnio (FDR) korekciją, tolesnei analizei buvo atrinktos tik statistiškai reikšmingos koreliacijos ($q < 0,05$; 3.5.1 lentelė). Statistiškai reikšmingi ryšiai nustatyti tarp didžiojo prieskrandžio temperatūros, gyvulių aktyvumo, rujos indekso bei termografiškai išmatuotos vulvos ir akies paviršiaus temperatūros.

3.6.1 lentelė. *Statistiškai reikšmingos koreliacijos tarp fiziologinių ir elgsenos rodiklių po Benjamini–Hochberg FDR korekcijos*

Rodikliai	Kontrolinė grupė (r)	q–reikšmė	Tiriamoji grupė (r)	q–reikšmė
Vulvos temperatūra—Akies temperatūra	0,37–0.50	<0,05	0,43–0,52	<0,05
Prieskrandžio temperatūra—Aktyvumas	0,72	<0,001	0,48	<0,05
Prieskrandžio tempratūra—Rujos indeksas	0,75	<0.001	0,60	<0,05
Aktyvumas—Rujos indeksas	0,65	<0.001	0,66	<0,001

Pastaba: r – Pearsono koreliacijos koeficientas; q–reikšmės apskaičiuotos taikant Benjamini–Hochberg klaidingų atradimų dažnio (FDR) korekciją.

Didžiojo prieskrandžio temperatūra buvo teigiamai susijusi su gyvulių aktyvumu abiejose grupėse. Kontrolinėje grupėje nustatytas didesnis koreliacijos koeficientas ($r = 0,72$; $q < 0,001$) nei tiriamojoje grupėje ($r = 0,48$; $q < 0,05$). Panašus ryšys nustatytas tarp didžiojo prieskrandžio temperatūros ir rujos indekso. Kontrolinėje grupėje koreliacijos koeficientas siekė $r = 0,75$ ($q < 0,001$), o tiriamojoje – $r = 0,60$ ($q < 0,05$). Taigi, didėjant didžiojo prieskrandžio temperatūrai buvo registruojamos ir didesnės aktyvumo bei rujos indekso reikšmės.

Aktyvumas taip pat teigiamai koreliavo su rujos indeksu. Šio ryšio dydis abiejose grupėse buvo labai panašus: kontrolinėje grupėje $r = 0,65$ ($q < 0,001$), o tiriamojoje – $r = 0,66$ ($q < 0,001$). Iš visų analizuotų ryšių būtent didžiojo prieskrandžio temperatūros, aktyvumo ir rujos indekso tarpusavio sąsajos buvo nuosekliausiai nustatomos abiejose grupėse. Toks rezultatų pasiskirstymas rodo, kad rujos laikotarpiu registruojami elgsenos ir vidinės temperatūros pokyčiai vyko lygiagrečiai.

Termografiškai vertintų rodiklių analizėje abiejose grupėse nustatytos teigiamos sąsajos tarp vulvos ir akies paviršiaus temperatūros. Kontrolinėje grupėje koreliacijos koeficientai kito nuo $r = 0,37$ iki $0,50$ ($q < 0,05$), o tiriamojoje – nuo $r = 0,43$ iki $0,52$ ($q < 0,05$). Taigi vulvos paviršiaus temperatūros pokyčius sekė tos pačios krypties akies srities temperatūros pokyčiai.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Tobulėjant molekuliniams mikroorganizmų identifikavimo metodams nustatyta, kad kliniškai sveikų galvijų gimdoje taip pat egzistuoja įvairi mikroorganizmų bendrija. Jos sudėtis gali kisti priklausomai nuo hormoninės būklės, vietinio imuninio atsako ir gimdos involiucijos eigos [6, 9, 182–184]. Todėl vien bakterijų buvimas nelaikomas patologija – svarbesnė yra visos mikrobiotos struktūra [6,48]. Dėl šios priežasties šiame tyrime buvo svarbu įvertinti, ar sausojo vynuogių ekstrakto sudėtyje esantys polifenoliai galėjo prisidėti prie palankesnės gimdos mikrobiotos formavimosi laikotarpiu po apsiveršiavimo.

Šiame tyrime abiejų grupių kliniškai sveikų karvių gimdos bakterinėje mikrobiotoje dominavo penki pagrindiniai tipai: *Firmicutes* – 40,9 proc., *Fusobacteria* – 20,3 proc., *Bacteroidetes* – 19,6 proc., *Actinobacteria* – 9,2 proc. ir *Proteobacteria* – 6,3 proc. Iš viso identifikuotos 605 bakterijų rūšys, rodančios didelę gimdos mikrobiotos taksonominę įvairovę. Santos ir kt., tyrę sveikų, metritu ir endometritu sirgusių karvių gimdos mikrobiotą laikotarpiu po apsiveršiavimo, nustatė tuos pačius pagrindinius bakterijų tipus, tačiau jų santykinė gausa ir mikrobiotos struktūra priklausė nuo gimdos sveikatingumo būklės. Autoriai nustatė, kad metritu sirgusių karvių mikrobiotai buvo būdingas didesnis *Fusobacteria* ir *Bacteroidetes* santykinis gausumas, o sveikų karvių gimdos mikrobiota pasižymėjo didesne bakterijų įvairove [48]. Panaši tendencija nustatyta ir vėlesniuose tyrimuose, kuriuose *Bacteroidetes* santykinis gausumas sveikų karvių gimdoje siekė apie 10 proc., o metritu sirgusių – daugiau kaip 45 proc., tuo tarpu *Fusobacterium* genties bakterijos sudarė atitinkamai apie 8 proc. ir 29,4 proc. bakterijų bendrijos.

Mūsų tyrime nustatytas didelis bakterijų rūšių skaičius ir *Firmicutes* dominavimas atitinka kliniškai sveikų karvių gimdos mikrobiotai būdingą didesnę taksonominę įvairovę. Kita vertus, nustatytas 20,3 proc. *Fusobacteria* ir 19,6 proc. *Bacteroidetes* santykinis gausumas rodo, kad šių su gimdos disbioze siejamų bakterijų tipų buvimas savaime nėra pakankamas patologinei būklei apibūdinti. Kadangi visos šiame tyrime dalyvavusios karvės buvo kliniškai sveikos, gauti rezultatai patvirtina, kad vertinant gimdos mikrobiotos būklę svarbu atsižvelgti ne tik į atskirų bakterijų tipų buvimą, bet ir į jų santykinę gausą, mikrobiotos įvairovę bei bakterijų sudėtį žemesniu taksonominiu lygmeniu.

Panašiai Clemmons ir bendraautoriai nustatė, kad karvių makšties ir gimdos bakterinės bendrijos pasižymi didele įvairove ir skiriasi tiek rūšių įvairove, tiek atskirų bakterinių taksonų santykine gausa [183]. Nors abiejose reprodukcinio trakto dalyse dominavo *Firmicutes* tipo bakterijos, gimdos

mikrobiota pasižymėjo didesniu neidentifikuotų taksonų kiekiu ir skirtinga kai kurių genčių bei šeimų sudėtimi, palyginti su makšties mikrobiota. Autoriai pabrėžė, kad šie mikrobiotos skirtumai greičiausiai atspindi fiziologinius reprodukcinio trakto ypatumus ir gali turėti reikšmės reprodukcinei būklei bei ankstyvajam veršingumui [183]. Pascottini ir kt. taip pat nustatė aiškią *postpartum* gimdos mikrobiotos dinamiką ir parodė, kad bakterinės bendrijos keičiasi vykstant gimdos involiucijai tiek kliniškai sveikoms, tiek endometritu sergančioms karvėms [184]. Tyrime, kuriame 16S rRNR geno sekoskaita buvo analizuojama Holšteinų karvių gimdos mikrobiota 10, 21 ir 35 parą po apsiveršiavimo, nustatyta, kad kliniškai sveikų ir subklinikiniu endometritu sirgusių karvių mikrobiotos sudėtis buvo panaši, o klinikiniu endometritu sirgusių karvių gimdoje mikrobiota pasižymėjo mažesne bakterijų įvairove ir ryškia disbioze. Be to, klinikinio endometrito atveju nustatyta didesnė *Bacteroidetes, Fusobacteria* tipų bei *Trueperella* genties bakterijų santykinė gausa, o *Trueperella pyogenes* buvo dažniausiai išskiriamas mikroorganizmas bakteriologinio tyrimo metu. Mūsų tyrime nustatyti duomenys pabrėžia, kad, vertinant įvairių intervencijų poveikį gimdos mikrobiotai, būtina atsižvelgti į fiziologinius *postpartum* laikotarpio pokyčius, nes mikrobiotos sudėtis natūraliai kinta vykstant gimdos involiucijai. Nors *Fusobacteria, Bacteroidetes* ir kai kurios *Actinobacteria* grupei priklausančios bakterijos, įskaitant *Trueperella pyogenes*, literatūroje dažnai siejamos su metritu ir endometritu, jų aptikimas pats savaime nepatvirtina gimdos ligos [6, 182, 184]. Šie mikroorganizmai gali būti nustatomi ir kliniškai sveikų karvių gimdoje, o patologijos vystymąsi lemia jų gausa, tarpusavio sąveika, ir karvės imuninis atsakas. Galvão ir bendraautoriai pabrėžė, kad gimdos ligos dažniausiai siejamos su mikrobinės bendrijos disbioze ir tam tikrų patogeninių taksonų dominavimu, o ne vien jų buvimu [6]. Mūsų tyrime tarp grupių nustatyta mikrobiotos sudėties skirtumų. Pirmąją savaitę tiriamojoje grupėje dominavo *Streptococcus suis* ir *Streptococcus porcinus–uberis*, o kontrolinėje grupėje nustatyta *Clostridium celatum, Lactobacillus ilealis* ir kitų *Clostridiales* atstovų. Devintąją savaitę tiriamojoje grupėje vyravo *Fusobacterium* genties bakterijos, o kontrolinėje grupėje nustatytas didesnis *Leptotrichiaceae, Histophilus* ir *Fusobacterium* taksonų santykinis gausumas. Tarp grupių nustatyti ir kitų bakterijų taksonų santykinio gausumo skirtumai. Visos tyrime dalyvavusios karvės buvo kliniškai ir reprodukciniu požiūriu sveikos, todėl potencialiai patogeniškų taksonų nustatymas vertintinas kaip gimdos mikrobiotos sudėties dalis, o ne kaip savaiminis patologijos požymis. Nustatyti mikrobiotos sudėties skirtumai leidžia kelti prielaidą apie galimą sausojo vynuogių ekstrakto sąsają su gimdos mikrobiotos struktūros pokyčiais laikotarpiu po apsiveršiavimo, tačiau šių skirtumų biologinei reikšmei ir galimam ekstrakto poveikiui pagrįsti reikalingi tolesni didesnės imties tyrimai.

Svarbi šio tyrimo dalis buvo ir gimdos grybinės mikrobiotos vertinimas. Duomenų apie galvijų reprodukcinio trakto mikobiotą yra gerokai mažiau negu apie bakterines bendrijas. De Carli ir bendraautoriai nustatė, kad galvijų reprodukciniame trakte gali būti aptinkami įvairūs grybai, tarp jų *Candida*, *Penicillium* ir *Aspergillus* genčių atstovai [10], tačiau tam tikromis sąlygomis jie gali būti siejami su endometritu, reprodukciniais sutrikimais ar sumažėjusiu vaisingumu [10, 11, 185, 186]. Sausojo vynuogių ekstrakto gavusių karvių mėginiuose nustatyta mažesnė kai kurių grybų, įskaitant su *Candida* gentimi siejamus taksonus, santykinė gausa, palyginti su kontroline grupe. Šis stebėjimas dera su antimikrobinėmis ir mikrobiotą moduliuojančiomis augalinių polifenolių savybėmis, tačiau dėl grupinių mėginių ir ribotos tyrimo apimties priežastinio ryšio nustatyti negalima. Be to, nėra pakankamai duomenų, leidžiančių apibrėžti normalią mėsinių karvių gimdos mikobiotą skirtingais laikotarpiais po apsiveršiavimo. Todėl mažesnė grybų santykinė gausa turėtų būti įvardijama kaip potencialiai palanki tendencija.

Mūsų tyrime nustatyta, kad Angus veislės mėsinių karvių gimdos bakterinės ir grybinės mikrobiotos sudėtis laikotarpiu po apsiveršiavimo kito, atspindėdama šiam laikotarpiui būdingus mikroorganizmų bendrijų pokyčius. Nustatyti dominuojantys bakterijų tipai ir jų santykinės gausos pokyčiai buvo panašūs į ankstesniuose tyrimuose aprašytas galvijų gimdos mikrobiotos kitimo tendencijas laikotarpiu po apsiveršiavimo [182, 184, 187–189]. Tolesniuose tyrimuose tikslinga taikyti individualų mėginių ėmimą, absoliutaus mikroorganizmų kiekio nustatymą ir metagenominę ar metatranskriptominę analizę, kartu vertinant vietinius uždegimo žymenis bei individualius reprodukcinius rodiklius.

Šiame tyrime sausojo vynuogių (*Vitis vinifera*) ekstrakto poveikis mėsinių karvių organizmui laikotarpiu po apsiveršiavimo buvo vertintas kompleksiškai, analizuojant gimdos bakterinės ir grybinės mikrobiotos sudėtį, oksidacinio streso žymenis, reprodukcinės funkcijos atsikūrimą ir jutikliais registruojamus fiziologinius bei elgsenos rodiklius. Toks tyrimo modelis svarbus todėl, kad reprodukcinės sistemos atsistatymas po apsiveršiavimo nėra vieno biologinio proceso rezultatas. Jį lemia gimdos involiucija, vietinio ir sisteminio imuninio atsako reguliacija, metabolinė adaptacija, antioksidacinės apsaugos būklė, pagumburio–hipofizės–kiaušidžių ašies aktyvumas ir gyvulio elgesio pokyčiai.

Glutationo peroksidazė yra vienas svarbiausių fermentinės antioksidacinės sistemos komponentų, dalyvaujantis vandenilio peroksido ir lipidų hidroperoksidų neutralizavime. Šiame tyrime GPx koncentracijos dinamika tarp grupių skyrėsi: kontrolinėje grupėje ji sumažėjo apie 52 proc., o tiriamojoje grupėje padidėjo t. y. apie 29 proc. Taigi, abiejose grupėse buvo stebimos priešingos GPx koncentracijos kitimo kryptys. Kadangi GPx yra svarbus fer-

mentinės antioksidacinės apsaugos komponentas, tiriamojoje grupėje nustatyta GPx didėjimo kryptis gali rodyti geriau išlaikytą antioksidacinės sistemos aktyvumą laikotarpiu po apsiveršiavimo, tuo tarpu kontrolinėje grupėje nustatytas jos mažėjimas gali būti siejamas su silpnėjančia fermentine antioksidacine apsauga. Vis dėlto statistinė analizė nepatvirtino reikšmingo grupės ($p = 0,600$) ar grupės ir laiko sąveikos ($p = 0,281$) poveikių, todėl nustatytų priešingų GPx kitimo krypčių negalima patikimai priskirti sausojo vynuogių ekstrakto poveikiui. Didelis individualus GPx koncentracijų kintamumas taip pat galėjo turėti įtakos statistiniam rezultatų reikšmingumui.

Panašūs rezultatai gauti Huang ir bendraautorių [124] tyrime, kuriame 48 ankstyvosios laktacijos Holšteinų veislės karvėms 50 dienų buvo skiriamas vynuogių sėklų proantocianidinų ekstraktas. Karvės buvo suskirstytos į keturias grupes ir gavo 0, 20, 40 arba 80 mg ekstrakto/kg kūno svorio per dieną. Nepaisant skirtingų ekstrakto dozių, statistiškai reikšmingo poveikio GPx aktyvumui nenustatyta. Reikšmingų skirtumų taip pat nenustatyta vertinant SOD aktyvumą ir bendrą antioksidacinį pajėgumą. Šie rezultatai iš dalies sutampa su šiame tyrime gautais duomenimis ir rodo, kad vynuogių kilmės polifenolių papildymas ne visais atvejais lemia statistiškai reikšmingus fermentinės antioksidacinės sistemos pokyčius.

Panašūs rezultatai nustatyti ir Gessner ir bendraautorių [120] tyrime, kuriame ankstyvosios laktacijos Holšteinų veislės karvėms nuo trijų savaičių prieš veršiavimąsi iki devintos savaitės po apsiveršiavimo buvo skiriamas 1 proc. vynuogių sėklų ir išspaudų ekstrakto priedas. Tyrime nenustatyta reikšmingo priedo poveikio GPX3 geno raiškai kepenyse ($p = 0,192$) ar priedo ir laiko sąveikos ($p = 0,132$). Reikšmingų pokyčių nenustatyta ir vertinant kitus antioksidacinės būklės rodiklius. Šie duomenys papildo šiame tyrime gautus rezultatus ir rodo, kad vynuogių kilmės produktų poveikis antioksidacinei sistemai laikotarpiu po apsiveršiavimo gali būti nepakankamai ryškus, kad pasireikštų statistiškai reikšmingais atskirų antioksidacinės sistemos rodiklių pokyčiais.

Kitame tyrime su jaunesniais galvijais nustatytos ryškesnės antioksidacinio atsako tendencijos. Nujunkytiems mėsinių veislių mišrūnams veršeliams 60 dienų skiriant po 4 g vynuogių sėklų ekstrakto per dieną, tyrimo pabaigoje GSH–Px aktyvumas ekstraktą gavusioje grupėje siekė 175,11 U/ml, o kontrolinėje – 162,38 U/ml. Nors skirtumas statistinio reikšmingumo nepasiekė, buvo nustatyta didesnio GSH–Px aktyvumo tendencija ($p = 0,078$). Tame pačiame tyrime ekstraktą gavusių veršelių SOD aktyvumas buvo reikšmingai didesnis (78,01 ir 73,17 U/ml; $p = 0,010$), bendras antioksidacinis pajėgumas buvo didesnis (6,46 ir 5,79 U/ml; $p = 0,047$), o MDA koncentracija mažesnė (4,59 ir 5,37 nmol/ml; $p = 0,027$) nei kontrolinės grupės veršelių.

Taigi literatūros duomenys, kaip ir šiame tyrime gauti rezultatai, rodo, kad vynuogių kilmės polifenolių poveikis fermentinei antioksidacinei sistemai nėra vienodas. Šiame tyrime nustatytos priešingos GPx kitimo kryptys – jos koncentracijos padidėjimas tiriamojoje ir sumažėjimas kontrolinėje grupėje – gali rodyti galimą sausojo vynuogių ekstrakto sąsają su geriau išlaikyta fermentine antioksidacine apsauga, tačiau statistiškai reikšmingos grupės ir laiko sąveikos nebuvimas neleidžia šio pokyčio laikyti patvirtintu ekstrakto poveikiu. Skirtingus tyrimų rezultatus gali lemti naudojamo vynuogių produkto sudėtis ir polifenolių koncentracija, jų biologinis prieinamumas, skiriama dozė, papildymo trukmė, gyvulių amžius, fiziologinė būklė ir pradinis oksidacinio streso intensyvumas.

Superoksido dismutazė (SOD) yra vienas pagrindinių fermentinės antioksidacinės sistemos komponentų, katalizuojantis superoksido radikalų virtimą vandenilio peroksidu ir taip prisidedantis prie ląstelių apsaugos nuo oksidacinio pažeidimo. Mūsų tyrime visais vertintais laikotarpiais SOD koncentracija tiriamojoje grupėje buvo skaitine išraiška didesnė nei kontrolinėje grupėje. Tyrimo pradžioje ji siekė atitinkamai 83,70 ± 46,32 ir 55,21 ± 49,34 ng/ml. Nors statistiškai reikšmingo grupės poveikio ($p = 0,120$) ir grupės bei laiko sąveikos ($p = 0,809$) nenustatyta, viso tyrimo metu išlikusi didesnių SOD koncentracijų kryptis tiriamojoje grupėje gali būti vertinama kaip biologinė tendencija.

Panašiai Li ir bendraautoriai, tyrę 30 Angus veislės bulių, nenustatė statistiškai reikšmingo vynuogių išspaudų poveikio SOD aktyvumui [190]. Gyvuliai buvo suskirstyti į tris grupes, kuriose 0, 10 arba 20 proc. kukurūzų siloso sausosios medžiagos buvo pakeista džiovintomis vynuogių išspaudomis. SOD aktyvumas kontrolinėje grupėje siekė 13,77 U/ml, 10 proc. vynuogių išspaudų grupėje – 14,34 U/ml, o 20 proc. grupėje – 14,06 U/ml; skirtumai tarp grupių nebuvo statistiškai reikšmingi ($p = 0,681$). Vis dėlto 10 proc. vynuogių išspaudų grupėje nustatytas reikšmingai didesnis katalazės aktyvumas – 29,39 U/ml, palyginti su 13,22 U/ml kontrolinėje ir 7,25 U/ml 20 proc. vynuogių išspaudų grupėje ($p = 0,004$). Tai rodo, kad vynuogių kilmės produktų poveikis antioksidacinei sistemai gali pasireikšti ne visų antioksidacinių fermentų pokyčiais vienu metu.

Kita vertus, Ürkmez ir Biricik tyrime su 60 karščio stresą patyrusių Holšteinų veislės veršelių nustatytas ryškesnis vynuogių sėklų ekstrakto poveikis SOD [125]. Veršeliai gavo 0, 25, 50 arba 100 mg/kg kūno svorio per dieną vynuogių sėklų ekstrakto. SOD koncentracija buvo reikšmingai didesnė 50 ir 100 mg/kg ekstrakto gavusių veršelių grupėse, palyginti su kontroline ir 25 mg/kg grupe ($p < 0,001$). Be to, visose ekstraktą gavusiose grupėse nustatyta mažesnė MDA koncentracija ($p < 0,01$), o 100 mg/kg dozę gavusių veršelių

bendras antioksidacinis pajėgumas 33 tyrimo dieną buvo didesnis nei kontrolinės grupės ($p = 0,02$).

Panašų teigiamą atsaką nustatė ir kiti autoriai, tyrę 30 nujunkytų mėsinių veislių mišrūnų veršelių [191]. Gyvuliams 60 dienų skiriant po 4 g vynuogių sėklų ekstrakto per dieną, SOD aktyvumas tiriamojoje grupėje tyrimo pabaigoje siekė 78,01 U/ml, o kontrolinėje – 73,17 U/ml, ir skirtumas buvo statistiškai reikšmingas ($p = 0,010$). Be to, ekstraktą gavusių veršelių bendras antioksidacinis pajėgumas buvo didesnis (6,46 ir 5,79 U/ml; $p = 0,047$), o MDA koncentracija mažesnė (4,59 ir 5,37 nmol/ml; $p = 0,027$). Taigi literatūroje pateikiami nevienodi SOD atsako į vynuogių kilmės produktus rezultatai. Li ir kt. tyrime su suaugusiais Angus buliais, kaip ir šiame tyrime, statistiškai reikšmingo SOD pokyčio nenustatyta, tuo tarpu tyrimuose su augančiais ar karščio stresą patiriančiais veršeliais vynuogių sėklų ekstraktas reikšmingai padidino SOD. Šie skirtumai gali būti susiję su gyvulių amžiumi ir fiziologine būkle, oksidacinio streso intensyvumu, naudojamo vynuogių produkto forma, polifenolių koncentracija, skiriama doze ir papildymo trukme. Todėl mūsų tyrime nustatyta nuosekli didesnių SOD koncentracijų kryptis tiriamojoje grupėje gali rodyti palankesnę antioksidacinės sistemos būklę, tačiau dėl statistiškai nereikšmingo grupės poveikio ir grupės bei laiko sąveikos jos negalima laikyti patvirtintu sausojo vynuogių ekstrakto poveikiu.

Malondialdehidas (MDA) susidaro vykstant polinesočiųjų riebalų rūgščių peroksidacijai, todėl jo koncentracija naudojama oksidacinio lipidų pažeidimo intensyvumui vertinti. Šiame tyrime MDA koncentracija mažėjo abiejose grupėse, tačiau skaitine išraiška ryškesnis sumažėjimas nustatytas tiriamojoje grupėje. Kontrolinėje grupėje MDA koncentracija sumažėjo apie 21 proc., o tiriamojoje – nuo t. y. apie 52 proc. Tokia MDA koncentracijos dinamika rodo mažėjantį lipidų peroksidacijos intensyvumą tyrimo laikotarpiu, o ryškesnis skaitinis sumažėjimas tiriamojoje grupėje gali būti vertinamas kaip palanki oksidacinės būklės kitimo kryptis.

Vis dėlto statistiškai reikšmingas buvo tik bendras laiko poveikis ($p = 0,043$), o grupės ($p = 0,992$) ir grupės bei laiko sąveikos ($p = 0,437$) poveikiai reikšmingi nebuvo. Todėl negalima teigti, kad ryškesnį MDA koncentracijos sumažėjimą tiriamojoje grupėje sukėlė sausasis vynuogių ekstraktas.

Vynuogių kilmės produktų gebėjimą mažinti lipidų oksidaciją patvirtina ir kiti tyrimai su galvijais, nors juose buvo vertinti skirtingi biologiniai mėginiai. Ianni ir bendraautoriai tyrė 10 Fryzų veislės karvių, kurių racionas 56 dienas buvo papildytas džiovintomis vynuogių išspaudomis, sudariusiomis 10 proc. raciono sausosios medžiagos [192]. Autoriai nustatė, kad vynuogių išspaudų įtraukimas į racioną pagerino iš šių karvių pieno pagamintų produktų oksidacinį stabilumą. Lipidų oksidacija buvo vertinama pagal tiobarbitūro rūgštimi reaguojančias medžiagas (TBARS), kurių nustatymui MDA

naudojamas kaip lipidų oksidacinio pažeidimo žymuo. Ryškesnis apsauginis poveikis nustatytas po 30 dienų sūrio brandinimo. Autoriai šį poveikį siejo su vynuogių išspaudose esančiais polifenoliniais junginiais ir jų antioksidacinėmis savybėmis.

Kito tyrimo metu penimų Džersių ir Holšteinų mišrūnų galvijų racionas papildytas dideliu vynuogių išspaudų kiekiu taip pat sumažino lipidų oksidaciją. Tyrime dalyvavo 24 galvijai, kuriems buvo skiriamas vynuogių išspaudų turintis racionas. Po skerdimo *Longissimus lumborum* ir *Semimembranosus* raumenyse buvo vertinama MDA koncentracija. Pirmosiomis laikymo dienomis skirtumų tarp grupių nenustatyta, tačiau 4, 6 ir 8 laikymo dienomis vynuogių išspaudas gavusių galvijų mėsoje MDA koncentracija buvo reikšmingai mažesnė nei kontrolinės grupės; nustatyta reikšminga raciono ir laikymo laiko sąveika ($p < 0,01$). Tai parodė didesnį mėsos lipidų oksidacinį stabilumą vynuogių išspaudas gavusių galvijų grupėje.

Šių tyrimų rezultatai nėra tiesiogiai tapatūs mūsų darbe gautiems duomenims, nes Ianni ir bendraautoriai oksidacinį stabilumą vertino pieno produktuose, o penimų galvijų tyrime MDA buvo nustatomas raumeniniame audinyje po skerdimo, tuo tarpu šiame tyrime MDA koncentracija nustatyta kraujo serume. Vis dėlto visuose tyrimuose stebima panaši biologinė kryptis – vynuogių kilmės polifenolių turinčių produktų vartojimas siejamas su didesniu lipidų oksidaciniu stabilumu. Mūsų tyrime nustatytas 52 proc. MDA koncentracijos sumažėjimas tiriamojoje grupėje, palyginti su 21 proc. sumažėjimu kontrolinėje grupėje, gali būti vertinamas kaip skaitinė mažesnio lipidų peroksidacijos intensyvumo kryptis. Tačiau statistiškai reikšmingos grupės ir laiko sąveikos poveikio nebuvimas neleidžia šio pokyčio laikyti patvirtinta sausojo vynuogių ekstrakto įtaka. Skirtumus tarp šiame ir kituose tyrimuose gautų rezultatų galėjo lemti vynuogių produkto forma ir polifenolių koncentracija, skiriama dozė, papildymo trukmė, gyvulių fiziologinė būklė ir biologinis mėginys, kuriame buvo vertinama lipidų peroksidacija.

Svarbiausias šiame tyrime nustatytas pokytis buvo trumpesnis laikotarpis nuo apsiveršiavimo iki pirmosios rujos sausojo vynuogių ekstrakto boliusus gavusioms karvėms. Tiriamojoje grupėje pirmoji ruja pasireiškė vidutiniškai po $23,88 \pm 1,86$ dienos, o kontrolinėje – po $39,82 \pm 5,05$ dienos, taigi tiriamojoje grupėje ji nustatyta vidutiniškai 15,94 dienos anksčiau. Medianinis laikas iki pirmosios rujos buvo atitinkamai 23 ir 41 diena. Kaplan–Meier analizė patvirtino statistiškai reikšmingą grupių skirtumą ($\chi^2 = 6,642$; $p = 0,010$), o bendrojo tiesinio modelio analizėje grupės poveikis taip pat buvo reikšmingas ($p = 0,048$; dalinis $\eta^2 = 0,21$). Šis rezultatas gali būti svarbus praktiniu požiūriu, nes užsitęsęs anestrus laikotarpis po apsiveršiavimo yra vienas iš veiksnių, ribojančių mėsinių karvių reprodukcinį efektyvumą.

Augalinės kilmės bioaktyviųjų junginių poveikis reprodukciniams rodikliams laikotarpiu po apsiveršiavimo nagrinėtas ir kituose tyrimuose. Kumar ir bendraautoriai, vertinę *Asparagus racemosus* šaknų miltelių papildo poveikį mišrūnėms karvėms, nustatė, kad šio augalinio papildo skyrimas prieš apsiveršiavimą ir po jo reikšmingai sutrumpino laikotarpį iki pirmosios rujos po apsiveršiavimo, sutrumpino *servis* periodą ir sumažino sėklinimų vienam apsivaisinimui skaičių, palyginti su kontroline grupe. Be to, papildą gavusioms karvėms nustatytas spartesnis gimdos involiucijos procesas [193]. Panašius rezultatus pateikė Amin ir bendraautoriai, tyrę karves, kurioms po apsiveršiavimo buvo nustatytas kiaušidžių funkcijos nepakankamumas. Jų naudoto augalinio preparato sudėtyje buvo *Cyperus rotundus* gumbų, *Moringa pterygosperma* lapų, *Zingiber officinale* šakniastiebių ir *Allium cepa* svogūnų. Po pirmojo preparato skyrimo rujos atsakas nustatytas 66,7 proc. tiriamosios grupės karvių, o po antrojo – 88,9 proc., palyginti su 20,0 proc. kontrolinėje grupėje. Apsivaisinimo rodiklis taip pat buvo didesnis augalinį preparatą gavusių karvių grupėje – atitinkamai 66,7 ir 20,0 proc. Šie rezultatai iš dalies sutampa su mūsų tyrime nustatytu ankstesniu pirmosios rujos pasireiškimu sausojo vynuogių ekstrakto boliusus gavusioms karvėms ir galima teigti, kad augalinės kilmės bioaktyviųjų junginių naudojimas yra susijęs su reprodukcinės veiklos atsinaujinimu po apsiveršiavimo. Vis dėlto tiesioginis šių tyrimų palyginimas yra ribotas dėl skirtingos naudotų augalinių produktų sudėties, jų dozių, papildymo trukmės bei tirtų gyvulių fiziologinės būklės.

Tiriamosios grupės karvių veršingumo rodiklis taip pat buvo skaitine išraiška didesnis – 88,9 proc., palyginti su 66,7 proc. kontrolinėje grupėje. Vis dėlto šis skirtumas statistinio reikšmingumo neturėjo, todėl negalima teigti, kad sausasis vynuogių ekstraktas padidino karvių veršingumo procentą. Nedidelė tyrimo imtis ribojo statistinę galią nustatyti grupių skirtumus. Vis dėlto skaitine išraiška didesnis veršingumo rodiklis gali būti vertinamas kartu su reikšmingai trumpesniu laikotarpiu iki pirmosios rujos. Antioksidacinės būklės ir vaisingumo sąsajas rodo Harrison ir bendraautorių tyrimas [194], kuriame 198 karvėms likus trims savaitėms iki numatomo veršiavimosi buvo skirta vitamino E ir seleno injekcija. Papildą gavusių karvių veršingumas po pirmojo sėklinimo buvo didesnis nei kontrolinių – atitinkamai 41,2 ir 25,3 proc. ($p = 0,02$), o sėklinimų vienam apsivaisinimui skaičius mažesnis – 2,3 ir 2,8 ($p = 0,03$). Tačiau laikotarpis iki pirmosios rujos nesiskyrė. Tai dar kartą rodo, kad skirtingi reprodukcinės funkcijos komponentai gali nevienodai reaguoti į antioksidacinės būklės pokyčius. Todėl mūsų tyrime nustatyti 88,9 ir 66,7 proc. veršingumo rodikliai turėtų būti vertinami kaip perspektyvus, tačiau statistiškai nepatvirtintas skirtumas. Didesnės imties tyrimas leistų nustatyti, ar ankstesnis reprodukcinio ciklo atsinaujinimas tiriamojoje grupėje yra susijęs ir su didesne apsivaisinimo tikimybe.

Nors laikotarpis iki pirmosios rujos tarp grupių reikšmingai skyrėsi, daugumai kitų fiziologinių ir elgsenos rodiklių grupės poveikis nenustatytas. Gyvulių aktyvumas tarp grupių reikšmingai nesiskyrė ($p = 0,367$). Tačiau koreliacinė analizė suteikė papildomos informacijos apie atskirų rodiklių tarpusavio sąsajas. Aktyvumas teigiamai koreliavo su rujos indeksu abiejose grupėse, o koreliacijos koeficientai buvo beveik vienodi – kontrolinėje grupėje $r = 0,65$ ($q < 0,001$), tiriamojoje – $r = 0,66$ ($q < 0,001$). Ši sąsaja yra biologiškai pagrįsta, nes padidėjęs judėjimo aktyvumas yra vienas būdingiausių rujos elgsenos pokyčių. Silper ir bendraautoriai, naudodami dvi skirtingas automatines aktyvumo stebėsenos sistemas Holšteinų veislės telyčioms, parodė, kad aktyvumo pokyčiai gali būti naudojami rujos išraiškai nustatyti ir kiekybiškai įvertinti [195].

Šiame tyrime beveik vienodi aktyvumo ir rujos indekso koreliacijos koeficientai abiejose grupėse yra ypač svarbūs interpretuojant ekstrakto poveikį. Kadangi ryšys vienodai pasireiškė ir kontrolinėje, ir tiriamojoje grupėje, jis greičiausiai atspindi bendrą rujai būdingą elgsenos procesą, o ne specifinį sausojo vynuogių ekstrakto poveikį. Tai taip pat dera su tuo, kad bendras grupės poveikis aktyvumui nebuvo statistiškai reikšmingas.

Didžiojo prieskrandžio temperatūrai statistiškai reikšmingo grupės poveikio taip pat nenustatyta ($p = 0,231$), tačiau koreliacinė analizė parodė jos sąsajas su rujos požymiais. Kontrolinėje grupėje didžiojo prieskrandžio temperatūra koreliavo su aktyvumu $r = 0,72$ ($q < 0,001$), o tiriamojoje – $r = 0,48$ ($q < 0,05$). Dar didesnis koreliacijos koeficientas kontrolinėje grupėje nustatytas tarp didžiojo prieskrandžio temperatūros ir rujos indekso – $r = 0,75$ ($q < 0,001$), o tiriamojoje grupėje jis siekė $r = 0,60$ ($q < 0,05$). Taigi abiejose grupėse didėjant didžiojo prieskrandžio temperatūrai buvo registruojamas didesnis gyvulių aktyvumas ir rujos indeksas, nors ryšio dydis tarp grupių skyrėsi. Panašius temperatūros ir rujos išraiškos pokyčius nustatė Burnett ir bendraautoriai, išanalizavę 190 rujos epizodų pieninėms karvėms, kurioms vienu metu buvo registruojama didžiojo prieskrandžio–tinklainio temperatūra ir aktyvumas [196]. Didžiausias teigiamas temperatūros pokytis rujos metu siekė $0,55 \pm 0,03$ °C, o ovuliacijos laikotarpiu – $0,26 \pm 0,04$ °C. Be to, ryškesnę rujos išraišką demonstravusioms karvėms nustatyti didesni temperatūros pokyčiai. Tai atitinka mūsų tyrime nustatytą teigiamą didžiojo prieskrandžio temperatūros ryšį su aktyvumu ir rujos indeksu. Vis dėlto Burnett ir bendraautoriams vien pagal temperatūros pokyčius suformuoti perspėjimai nepasiekė pakankamo tikslumo patikimai rujai ar ovuliacijai nustatyti. Taigi didžiojo prieskrandžio temperatūra gali suteikti papildomos informacijos apie rujos metu vykstančius fiziologinius pokyčius, tačiau ją tikslinga vertinti kartu su elgsenos rodikliais.

Akies ir vulvos paviršiaus temperatūroms statistiškai reikšmingo grupės poveikio nenustatyta (akies $p = 0,685$ ir vulvos $p = 0,176$). Tačiau termografinių rodiklių koreliacinė analizė parodė teigiamas vulvos ir akies temperatūros sąsajas. Kontrolinėje grupėje koreliacijos koeficientai kito nuo $r = 0,37$ iki 0,50, o tiriamojoje – nuo $r = 0,43$ iki 0,52 ($q < 0,05$). Tai rodo, kad skirtingose anatominėse srityse registruoti paviršiaus temperatūros pokyčiai tam tikru mastu pasižymėjo panašia tendencija. Termografijos galimybes reprodukcinei būklei vertinti tyrė Talukder ir bendraautoriai [197]. Jų duomenimis, vulvos paviršiaus temperatūros pokyčiai galėjo būti naudojami ovuliacijai prognozuoti 24–48 val. iš anksto. Taikant 1,0 °C temperatūros padidėjimo ribą, metodo jautrumas siekė 83 proc., specifiškumas – 43 proc., o teigiama prognostinė vertė – 71 proc.. Tačiau vulvos sritis praktiniu požiūriu turi trūkumų – matavimui įtakos gali turėti uodega ir užterštumas, todėl akies sritis dėl lengvesnio automatinio stebėjimo taip pat vertinama kaip potenciali termografinio monitoringo vieta. Mūsų tyrime nustatyta vulvos ir akies temperatūrų sąsaja patvirtina, kad periferinės temperatūros pokyčiai nėra visiškai nepriklausomi. Vis dėlto nei akies, nei vulvos temperatūrai grupės poveikis nebuvo reikšmingas, o ankstesnių tyrimų duomenys rodo ribotą vien termografija pagrįstos rujos diagnostikos tikslumą. Dėl šios priežasties termografinius rodiklius tikslingiau vertinti kaip papildomą, o ne savarankišką rujos nustatymo priemonę.

Estradiolio ir progesterono koncentracijoms sausojo vynuogių ekstrakto papildymas statistiškai reikšmingo poveikio taip pat neturėjo (estradiolio $p = 0,437$ ir progesterono $p = 0,893$). Tai svarbu interpretuojant reikšmingai ankstesnę pirmąją rują tiriamojoje grupėje. Nors ekstraktą gavusių karvių reprodukcinis ciklas atsinaujino anksčiau, taikyta savaitinė kraujo mėginių ėmimo schema galėjo būti nepakankamai dažna trumpalaikiams estradiolio pokyčiams, susijusiems su preovuliaciniu folikulu, užfiksuoti. Apibendrinant fiziologinių ir elgsenos rodiklių rezultatus, svarbu tai, kad reikšmingos jų tarpusavio sąsajos buvo nustatytos abiejose grupėse. Aktyvumas koreliavo su rujos indeksu, o didžiojo prieskrandžio temperatūra – tiek su aktyvumu, tiek su rujos indeksu. Termografinėje analizėje taip pat nustatytos vulvos ir akies paviršiaus temperatūrų sąsajos. Kadangi šie ryšiai pasireiškė ir kontrolinėje, ir tiriamojoje grupėje, jie greičiausiai atspindi bendrus rujos metu vykstančius fiziologinius ir elgsenos procesus, o ne specifinį sausojo vynuogių ekstrakto poveikį.

Šie rezultatai kartu pagrindžia integruoto kelių parametrų vertinimo svarbą. Saint–Dizier ir kt. apžvalgoje nurodoma, kad temperatūros ir akselerometro duomenų integravimas skirtingose galvijų veislėse ir laikymo sistemose leido pasiekti didesnį nei 90 proc. rujos nustatymo tikslumą [198]. Kelių parametrų naudojimas taip pat padeda sumažinti klaidingų perspėjimų, kuriuos

gali sukelti aplinkos temperatūros pokyčiai, gyvulių tarpusavio sąveika ar su ruja nesusijęs aktyvumo padidėjimas, skaičių.

Taigi šiame tyrime nustatytos didžiojo prieskrandžio temperatūros, aktyvumo, rujos indekso ir termografinių rodiklių tarpusavio sąsajos rodo, kad šie parametrai gali suteikti daugiau informacijos apie reprodukcinę būklę vertinami kartu nei analizuojami atskirai. Nors sausasis vynuogių ekstraktas neturėjo statistiškai reikšmingo poveikio daugumai atskirų fiziologinių ir hormoninių rodiklių, reikšmingai ankstesnis pirmosios rujos pasireiškimas tiriamojoje grupėje rodo galimą jo sąsają su spartesniu reprodukcinės veiklos atsinaujinimu po apsiveršiavimo. Dėl nedidelės tyrimo imties tiek galimas ekstrakto poveikis veršingumui, tiek integruotų fiziologinių rodiklių diagnostinė vertė turėtų būti patvirtinti didesnės apimties tyrimuose.

Apibendrinant, šio darbo rezultatai rodo, kad sausojo vynuogių ekstrakto boliusus gavusioms karvėms pirmoji ruja po apsiveršiavimo pasireiškė reikšmingai anksčiau, tačiau ekstraktas neturėjo statistiškai reikšmingo poveikio daugumai kitų reprodukcinių, fiziologinių ir oksidacinio streso rodiklių. Gimdos mikrobiotoje nustatyti skirtumai tarp tiriamosios ir kontrolinės grupių bei stebėtos potencialiai palankios bakterinės ir grybinės mikrobiotos pokyčių tendencijos. Vis dėlto dėl grupinių mėginių analizės pobūdžio negalima vienareikšmiškai nustatyti, ar šie skirtumai buvo tiesiogiai susiję su sausojo vynuogių ekstrakto papildų naudojimu, todėl jų biologinei ir klinikinei reikšmei įvertinti reikalingi tolesni individualių mėginių tyrimai.

IŠVADOS

1. Mėsinių karvių gimdos bakterinės ir grybinės mikrobiotos sudėtis *postpartum* periodu kito priklausomai nuo mėginių paėmimo laiko. Bakterinėje mikrobiotoje dominavo *Firmicutes, Fusobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria* ir *Proteobacteria*, o grybinėje – *Ascomycota, Basidiomycota* ir *Chytridiomycota*. Tarp tiriamosios ir kontrolinės grupių nustatyti mikrobiotos sudėties skirtumai leidžia įžvelgti galimas sąsajas su sausojo vynuogių ekstrakto papildymu, tačiau dėl ribotų individualių taksonų statistinio palyginimo galimybių jie negali būti vertinami kaip statistiškai patvirtintas ekstrakto poveikis gimdos mikrobiotai.
   1.1. Pirmąją savaitę *postpartum* abiejose grupėse dominavo *Firmicutes* tipo bakterijos, tačiau jų rūšinė sudėtis skyrėsi: tiriamojoje grupėje vyravo *Streptococcus suis ir S. porcinus–uberis*, o kontrolinėje – *Clostridium celatum* ir *Lactobacillus ilealis*. Grybinėje mikrobiotoje tiriamojoje grupėje didžiausiu santykiniu gausumu pasižymėjo *Suhomyces xylopsoci*, taip pat nustatyta *Aspergillus* ir *Penicillium* genčių grybų, o kontrolinėje grupėje didesniu santykiniu gausumu pasižymėjo *Pichia* ir Penicillium genčių atstovai.
   1.2. Devintąją savaitę *postpartum* tarp grupių nustatyti bakterinės ir grybinės mikrobiotos sudėties skirtumai. Tiriamojoje grupėje nustatytas mažesnis su gimdos infekcijomis siejamų *Trueperella pyogenes* ir *Histophilus somni* santykinis gausumas. Grybinėje mikrobiotoje kontrolinėje grupėje nustatytos *Candida guilliermondii* ir *C. parapsilosis*, o tiriamojoje grupėje didžiausiu santykiniu gausumu pasižymėjo *Suhomyces xylopsoci*, taip pat nustatyta *Scedosporium* ir *Penicillium* genčių grybų. Atsižvelgiant į ribotas individualių taksonų statistinio palyginimo galimybes, nustatyti grupių skirtumai vertintini kaip mikrobiotos sudėties tendencijos, o ne kaip statistiškai patvirtintas sausojo vynuogių ekstrakto poveikis.

2. Sausojo vynuogių ekstrakto papildymas neturėjo statistiškai reikšmingo poveikio oksidacinio streso rodikliams – glutationo peroksidazės (GPx), superoksido dismutazės (SOD) ir malondialdehido (MDA) koncentracijoms. Tiriamojoje grupėje stebėta GPx koncentracijos didėjimo tendencija, SOD koncentracija viso tyrimo metu išliko didesnė, o MDA koncentracija mažėjo ryškiau nei kontrolinėje grupėje, tačiau šios tendencijos statistiškai reikšmingais grupių skirtumais nepasireiškė. MDA koncentracijai nustatytas statistiškai reikšmingas laiko poveikis ($p = 0,043$), rodantis jos mažėjimą tyrimo laikotarpiu nepriklausomai nuo grupės.

3. Vertinant sausojo vynuogių ekstrakto sąsajas su mėsinių karvių reprodukciniais, fiziologiniais ir hormoniniais rodikliais *postpartum* periodu, pagrindinis statistiškai patvirtintas rezultatas buvo trumpesnis laikotarpis iki pirmosios rujos, o kitų vertintų rodiklių statistiškai reikšmingų skirtumų tarp grupių nenustatyta.
   3.1. Sausojo vynuogių ekstrakto papildymas statistiškai reikšmingai sutrumpino laikotarpį nuo apsiveršiavimo iki pirmosios rujos – tiriamosios grupės karvėms pirmoji ruja pasireiškė vidutiniškai 15,94 dienos anksčiau nei kontrolinės grupės karvėms (23,88 ± 1,86 ir 39,82 ± 5,05 dienos; $p = 0,010$).
   3.2. Tiriamojoje grupėje nustatyta didesnio veršingumo tendencija – veršingumas siekė 88,9 proc., palyginti su 66,7 proc. kontrolinėje grupėje, tačiau skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas, todėl didesnis veršingumo rodiklis negali būti vertinamas kaip patvirtintas sausojo vynuogių ekstrakto poveikis.
   3.3. Sausojo vynuogių ekstrakto papildymas neturėjo statistiškai reikšmingo poveikio gyvulių aktyvumui, didžiojo prieskrandžio temperatūrai, akies paviršiaus ir vulvos temperatūrai bei estradiolio ir progesterono koncentracijoms, todėl ekstrakto poveikis vertintiems fiziologiniams ir hormoniniams rodikliams nebuvo patvirtintas.

REKOMENDACIJOS

Mėsinių galvijų ūkiuose reprodukcinei būklei po apsiveršiavimo stebėti rekomenduojama taikyti kompleksinę tiksliosios gyvulininkystės technologijų sistemą, derinant aktyvumo stebėseną, termografinius tyrimus, didžiojo prieskrandžio temperatūros stebėseną ir hormoninius tyrimus.

Atsižvelgiant į šiame tyrime nustatytą reikšmingai trumpesnį laikotarpį iki pirmosios rujos, sausojo vynuogių (*Vitis vinifera*) ekstrakto naudojimas gali būti svarstomas kaip perspektyvi natūrali priemonė reprodukcinei funkcijai palaikyti laikotarpiu po apsiveršiavimo, tačiau prieš diegiant ją į plačią praktiką būtini išsamesni tyrimai.

SUMMARY

INTRODUCTION

Reproductive efficiency in beef cattle is one of the key factors determining herd productivity, economic sustainability, and the competitiveness of cattle farming systems. The primary objective of reproductive management is to ensure that each cow produces one calf per year, as the calving interval directly affects the number of calves produced per cow over her lifetime, as well as the productive lifespan of the animals and the overall economic performance of the farm [1]. To achieve optimal reproductive efficiency, ovarian cyclicity must resume in a timely manner after calving so that cows can be successfully bred within the designated breeding period. The postpartum period is one of the most physiologically challenging stages in a cow's life, during which uterine involution, endometrial regeneration, restoration of ovarian cyclic activity and hormonal balance, as well as metabolic adaptations, take place. Disruption of any of these processes may prolong the interval to first estrus, reduce the probability of conception, and adversely affect the reproductive performance of the entire herd [2, 3].

In recent years, the understanding of reproductive system recovery during the postpartum period has changed substantially. For a long time, the healthy bovine uterus was considered sterile; however, with the introduction of culture–independent molecular methods, particularly 16S rRNA gene sequencing, it has been demonstrated that low–biomass microbial communities may be detected in the uterus of healthy cows, and that their composition and diversity are associated with the physiological status of the reproductive system [4–6]. In the review by Çömlekcioğlu et al., microbial diversity is identified as an important indicator of uterine health, as reduced diversity has been associated with metritis and clinical endometritis. The uterine microbiota of cows with metritis is characterised by a higher relative abundance of the phyla *Fusobacteria* and *Bacteroidetes*, while at the genus level, *Bacteroides, Fusobacterium*, and *Porphyromonas* have been associated with the disease. In cases of clinical endometritis, increased relative abundances of *Fusobacterium, Bacteroides*, and *Trueperella* have been reported [5]. The authors also emphasise that, due to substantial inter–individual variability and differences in methodologies applied across studies, a consistent composition of the healthy bovine uterine microbiota has not yet been established [5].

Increasing attention is being paid not only to the bacterial but also to the fungal uterine microbiota. Although fungal communities have been studied to a considerably lesser extent, they are also thought to play a role in regulating local immune responses and maintaining uterine homeostasis [7–10]. Recent

publications emphasise that recovery of the reproductive system is determined not by individual microorganisms alone, but by interactions between the entire microbial community and the host immune system. Consequently, contemporary research is increasingly focused not on the identification of individual pathogens, but on the analysis of microbial balance, inflammatory processes, and the mechanisms involved in the restoration of uterine homeostasis [6,11–13].

Another important factor affecting the recovery of reproductive function is oxidative stress. Under physiological conditions, reactive oxygen species are involved in steroidogenesis, follicular growth, ovulation, and the regulation of other cellular signalling processes; however, their excessive accumulation can damage lipids, proteins, and nucleic acids, activate inflammatory processes, and impair reproductive tissue function. Following calving, the risk of oxidative stress increases substantially due to increased energy demands, intensive lipid metabolism, and activation of the immune system, which may impair uterine involution, follicular development, and the resumption of reproductive cyclicity. Therefore, oxidative stress markers such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), and malondialdehyde (MDA) are considered important indicators of the functional status of the reproductive system [3, 14–16].

In recent years, increasing research attention has also been directed towards the use of natural plant–derived antioxidants in animal production. Among the most promising bioactive compounds are grape (Vitis vinifera) polyphenols, which exhibit antioxidant, anti–inflammatory, and antimicrobial properties. These compounds have been shown to activate the Nrf2–Keap1 (nuclear factor erythroid 2–related factor 2–Kelch–like ECH–associated protein 1) signalling pathway, stimulate the synthesis of endogenous antioxidant enzymes, suppress nuclear factor kappa B (NF–κB) activity, and reduce the expression of inflammatory cytokines, thereby potentially contributing to protection against oxidative damage [14, 16–18]. In their review, Eder et al. emphasised that grape–derived products may reduce oxidative stress and inflammatory processes in various animal species; however, data regarding their effects on bovine reproduction remain limited, and no consensus has yet been reached regarding their associations with fertility outcomes [15].

Due to its high concentration of biologically active polyphenols, dry grape extract may represent a promising natural feed supplement capable of contributing to antioxidant defence and the regulation of inflammatory processes. However, its effects on the recovery of the reproductive system in beef cows during the postpartum period and its potential associations with changes in the uterine microbiota remain insufficiently investigated.

Another important area of contemporary reproductive research is the application of precision livestock farming technologies. Activity sensors, infrared thermography, ruminal temperature monitoring, and other automated systems enable continuous recording of physiological and behavioural changes in animals, facilitating more accurate estrus detection and early identification of reproductive disorders [19–23]. Integrating these technologies with molecular analyses of the microbiota and assessments of oxidative stress markers provides opportunities to gain a more comprehensive understanding of the mechanisms underlying reproductive system recovery and to develop individualised reproductive management strategies.

Considering recent evidence regarding the importance of the uterine microbiota for reproductive health, the growing interest in the use of natural polyphenols in animal production, and the development of precision livestock farming technologies, there remains a lack of studies comprehensively evaluating the effects of dry grape (*Vitis vinifera*) extract on reproductive system recovery in beef cows during the postpartum period. In particular, limited information is available on the associations between grape extract supplementation and changes in the uterine microbiota, oxidative stress markers, and reproductive processes when these changes are assessed in conjunction with precision livestock farming technologies. Therefore, in the present study, the effects of dry grape extract supplementation on the reproductive system of beef cows during the postpartum period were evaluated comprehensively by analysing changes in the uterine microbiota, oxidative stress markers, reproductive parameters, and physiological variables recorded using modern monitoring technologies.

The aim of the study:

To evaluate the effect of dry grape (*Vitis vinifera*) extract, possessing antioxidant properties, on the reproductive performance of beef cattle during the postpartum period by applying modern precision livestock farming technologies and assessing uterine microbiota changes, reproductive performance, and oxidative stress biomarkers.

The objectives of the study:

1. To investigate the influence of dry grape (*Vitis vinifera*) extract on the composition and dynamics of the postpartum uterine bacterial and fungal microbiota.
2. To evaluate the effect of dry grape (*Vitis vinifera*) extract on oxidative stress biomarkers, including glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA), during the postpartum period.

3. To assess the effect of dry grape (*Vitis vinifera*) extract on the reproductive performance of beef cattle during the postpartum period using modern precision livestock farming technologies.

Relevance and novelty of the work:

In recent years, increasing attention has been directed toward the application of natural plant–derived bioactive compounds to improve cattle reproduction. However, the biological mechanisms underlying their effects during the postpartum period remain insufficiently understood. To date, most studies have primarily focused on reproductive performance, while limited information is available regarding the potential effects of polyphenols on the uterine microbiota, oxidative stress, and the interactions among these factors in beef cattle.

The present study comprehensively evaluated the effects of dry grape (*Vitis vinifera*) extract on the reproductive performance of beef cattle during the postpartum period. For the first time, reproductive performance, changes in the uterine bacterial and fungal microbiota, and oxidative stress biomarkers (superoxide dismutase [SOD], glutathione peroxidase [GPx], and malondialdehyde [MDA]) were simultaneously assessed within a single study, while modern precision livestock farming technologies were employed to monitor reproductive processes. This integrated study design enabled a more comprehensive evaluation of the potential effects of dry grape extract on the recovery of the reproductive system during the postpartum period.

The findings of this study expand current knowledge regarding the potential application of polyphenols in beef cattle reproductive management and provide new insights into their possible effects on uterine microbiota composition and oxidative stress. Furthermore, the results may contribute to the development of improved reproductive management strategies for beef cattle through the use of natural antioxidants in feeding practices and the implementation of precision livestock farming technologies for monitoring reproductive processes under commercial farm conditions.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals and experimental design

The scientific research was conducted from 2021 to 2026 at the Institute of Animal Science of the Lithuanian University of Health Sciences. All procedures involving animals were carried out in accordance with the requirements of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific

purposes [154]. The study was also conducted in compliance with the Law on the Welfare and Protection of Animals of the Republic of Lithuania (No. IX–2271) [155] and the legal acts approved by the State Food and Veterinary Service of the Republic of Lithuania regulating the housing, care, use, and welfare of animals used in experiments [156]. The study was approved at a meeting of the Council of the Institute of Animal Science of the Lithuanian University of Health Sciences (Protocol No. 24/01/30/01). The study methodology was approved at a meeting of the Methodological Commission (Protocol No. 23/05/30/01).

Biochemical and hormonal analyses were performed at the Animal Reproduction Laboratory of the Large Animal Clinic, Veterinary Academy, Lithuanian University of Health Sciences. Oxidative stress biomarkers were analysed at the Laboratory of Biochemistry, Institute of Neurosciences, Lithuanian University of Health Sciences, while uterine microbiota analyses were performed at the Zymo Research laboratory (Irvine, California, USA). The experimental design is presented in Figure 2.1.1.

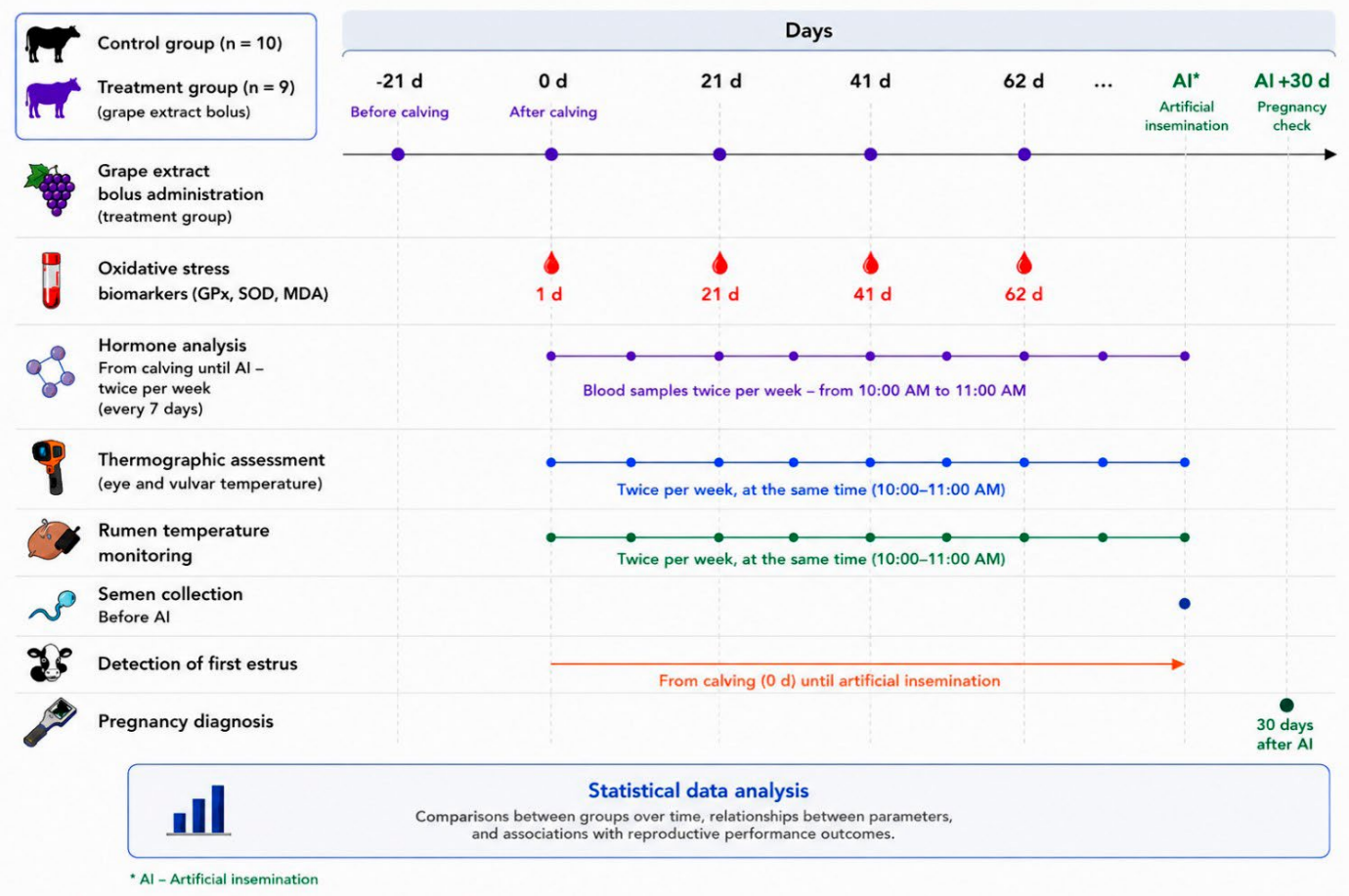


Figure 2.1.1. *Experimental design*

Nineteen Angus cows aged 2–10 years were included in the study. Both primiparous and multiparous animals were enrolled, with an average parity of approximately 2.8. Only clinically and reproductively healthy animals that calved without veterinary assistance and showed no reproductive complications were included.

The animals were divided into two groups. The control group (C; n = 10) consisted of four primiparous and six multiparous cows, with an average parity of 2.8. The treatment group (T; n = 9) consisted of four primiparous and five multiparous cows, with an average parity of 2.9. Multiparous cows were allocated according to parity to ensure comparable groups, whereas primiparous animals were assigned randomly.

All cows were housed in a free–stall barn in Baisogala, Lithuania. The experiment was conducted from March to June. Animals were provided with free access to water and received the same total mixed ration once daily. The ration consisted of 65% grass silage, 25% corn silage, 7% wheat straw and 3% compound feed containing corn, wheat and rapeseed.

Cows in the treatment group received slow–release boluses containing 14.8 g of dry grape (Vitis vinifera) extract. Five boluses were administered to each treated cow: 21 days before the expected calving date, on the day of calving and at approximately 21, 42 and 63 days postpartum. Boluses were administered between 10:00 and 11:00 a.m.

The grape extract was encapsulated in a plant–derived matrix designed to reduce rapid degradation of biologically active compounds in the rumen and provide gradual release for approximately three weeks. The extract contained more than 60% total polyphenols, including more than 45% proanthocyanidins and more than 0.3% anthocyanins.

2.2. Uterine microbiota analysis

Uterine samples were collected from all cows in the first and ninth weeks after calving.

The uterine microbiota analysis scheme is presented in Fig. 2.2.1.

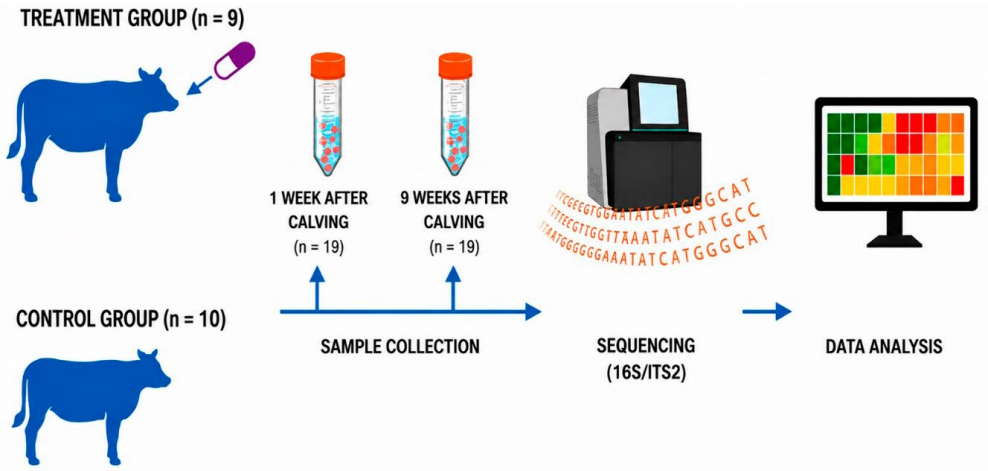


Figure 2.2.1. *Uterine microbiota analysis scheme*

Before sampling, the perineal and vulvar regions were cleaned, disinfected with 70% ethanol, and dried. A sterile insemination pipette was introduced through the vagina and cervix into the uterine body. Correct positioning was additionally controlled using ultrasonography.

Thirty millilitres of sterile physiological saline were infused into the uterus. Following gentle transrectal uterine massage, the fluid was aspirated to recover lavage fluid, and approximately 5–15 mL of uterine lavage fluid was recovered. Samples were immediately transferred into sterile tubes and transported on ice for further processing.

Equal volumes of individual samples were pooled before sequencing. The pooled samples were mixed with DNA/RNA Shield and stored at −80 °C. Although pooling reduced the ability to evaluate individual animal–level variation, it enabled an exploratory assessment of uterine bacterial and fungal community composition.

Bacterial communities were analysed by sequencing the V3–V4 region of the 16S rRNA gene, whereas fungal communities were characterized by sequencing the ITS2 region. Genomic DNA extraction and sequencing were performed using the ZymoBIOMICS targeted sequencing platform.

Amplicon sequence variants were identified using the DADA2 algorithm, while taxonomic classification and microbial community analyses were performed using QIIME. LEfSe analysis was used to identify discriminating microbial taxa, and microbial community patterns were visualized using heatmaps and other bioinformatic approaches.

2.3. Oxidative stress biomarkers

Blood serum was prepared as described and stored at –80°C until analysis. Serum concentrations of bovine Glutathione Peroxidase (GPx), Superoxide Dismutase (SOD), and Malondialdehyde (MDA) were determined using commercially available ELISA kits (GPx – MyBioSource MBS289398; SOD – Cusabio CSB–E14090B; MDA – MyBioSource MBS739193) according to the manufacturers' instructions. Undiluted serum was used for GPx and SOD while serum for MDA analysis was centrifuged at 1000 x g for 10 min and diluted 2–fold prior to analysis. Absorbance was measured using the Infinite 200 PRO plate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland).

2.4. Hormonal analysis and infrared thermography

Blood samples were collected weekly from calving until artificial insemination. Sampling was consistently performed between 10:00 and 11:00 a.m. to minimize the potential effect of circadian variation.

Serum progesterone and 17β–estradiol concentrations were measured using commercial ELISA kits. The analytical range for both hormones was 0–40 ng/mL.

Infrared thermographic measurements were performed simultaneously with blood sampling. Ocular and vulvar surface temperatures were recorded using a FLIR E540 infrared thermographic camera. The emissivity coefficient was set to 0.98.

Environmental temperature and relative humidity were recorded during measurements and incorporated into the thermographic analysis. Environmental temperature ranged from 18 to 22 °C and relative humidity from 40 to 63%.

Thermographic images were obtained from approximately one metre from the animal under standardized indoor conditions. Mean, minimum and maximum temperatures were determined for the selected anatomical regions. Maximum surface temperature was used for statistical analysis.

2.5. Reticulorumen temperature and activity monitoring

Reticulorumen temperature was continuously recorded using smaXtec animal care technology intraruminal boluses. Measurements were automatically recorded every 10 min from the beginning of supplementation until artificial insemination.

The monitoring system also provided activity data and an automatically generated estrus index. These measurements allowed continuous assessment of physiological and behavioural changes during the *postpartum* period.

2.6. Determination of first postpartum estrus and pregnancy

The first postpartum estrus was identified using internal temperature data and the automated estrus index generated by the smaXtec system, supported by behavioural signs recorded during weekly clinical observations

For each cow, the interval between calving and first detected estrus was calculated in days. Kaplan–Meier survival analysis was additionally performed, considering the occurrence of first estrus as the event of interest. The control and treatment curves were compared using the log–rank (Mantel–Cox) test.

Pregnancy rate was calculated as the percentage of inseminated cows that subsequently became pregnant.

2.7. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics and R. Descriptive data were expressed as mean ± standard deviation or estimated marginal mean ± standard error, depending on the analytical procedure

Changes in GPx, SOD and MDA concentrations over time were analysed using linear mixed–effects models. Group, sampling time and their interaction were included as fixed effects, whereas animal was included as a random effect.

Linear mixed models and general linear models were also used to compare reproductive periods and experimental groups. Effect size was expressed as partial eta squared where applicable

Pearson correlation coefficients were calculated to investigate relationships among thermographic, physiological, hormonal and behavioural variables. To account for multiple comparisons, p–values were adjusted using the Benjamini–Hochberg false discovery rate procedure. Adjusted q–values <0.05 were considered statistically significant.

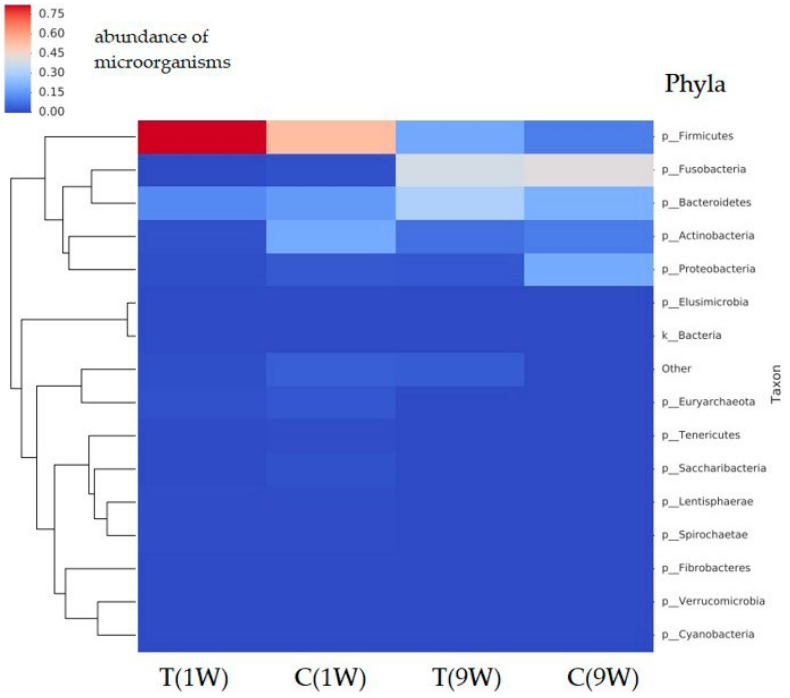
Repeated–measures correlation was additionally applied to assess relationships among oxidative stress biomarkers. Statistical significance for other analyses was defined as $p < 0.05$, while $0.05 \leq p < 0.10$ was interpreted as a statistical tendency.

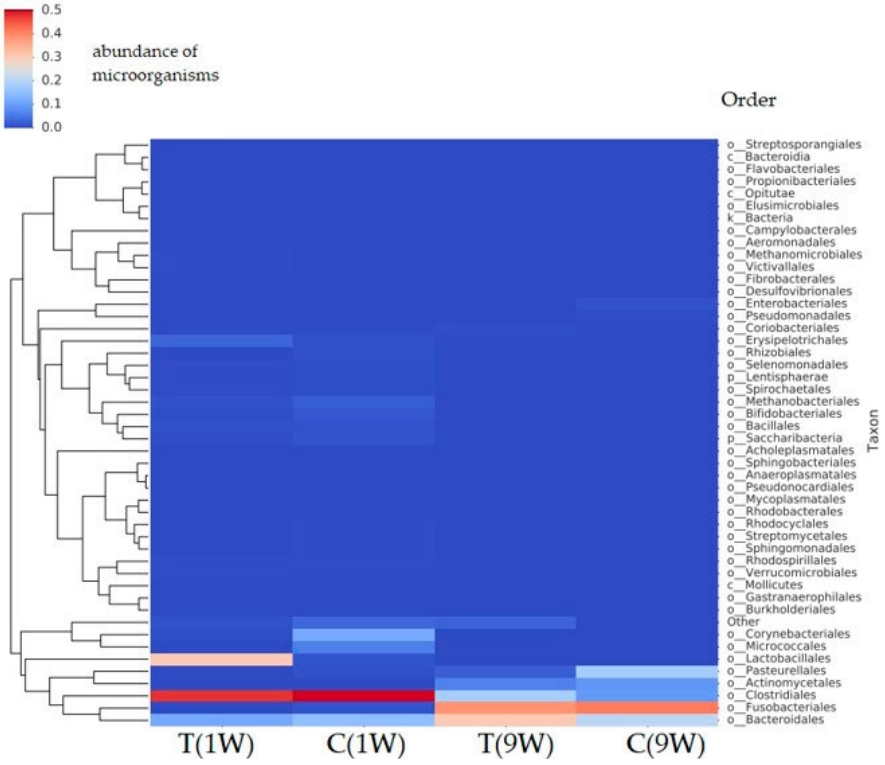
3. RESEARCH RESULTS

3.1. Uterine microbiota analysis results

3.1.1. Bacterial composition of the uterine microbiota in beef cows

The taxonomic composition of the uterine bacterial microbiota in beef cows at the phylum (*Phylum*), order (*Order*), and species (*Species*) levels is presented in Fig. 3.1.1.1.


0.75
0.60
0.45
0.30
0.15
0.00
abundance of
microorganisms
Phyla
p__Firmicutes
p__Fusobacteria
p__Bacteroidetes
p__Actinobacteria
p__Proteobacteria
p__Elusimicrobia
k__Bacteria
Other
p__Euryarchaeota
p__Tenericutes
p__Saccharibacteria
p__Lentisphaerae
p__Spirochaetae
p__Fibrobacteres
p__Verrucomicrobia
p__Cyanobacteria
Taxon
T(1W)
C(1W)
T(9W)
C(9W)


0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
abundance of
microorganisms
Order
o__Streptosporangiales
c__Bacteroidia
o__Flavobacteriales
o__Propionibacteriales
c__Opitutae
o__Elusimicrobiales
k__Bacteria
o__Campylobacterales
o__Aeromonadales
o__Methanomicrobiales
o__Victivallales
o__Fibrobacterales
o__Desulfovibrionales
o__Enterobacteriales
o__Pseudomonadales
o__Coriobacteriales
o__Erysipelotrichales
o__Rhizobiales
o__Selenomonadales
p__Lentisphaerae
o__Spirochaetales
o__Methanobacteriales
o__Bifidobacteriales
o__Bacillales
p__Saccharibacteria
o__Acholeplasmatales
o__Sphingobacteriales
o__Anaeroplasmatales
o__Pseudonocardiales
o__Mycoplasmatales
o__Rhodobacterales
o__Rhodocyclales
o__Streptomycetales
o__Sphingomonadales
o__Rhodospirillales
o__Verrucomicrobiales
c__Mollicutes
o__Gastranaerophilales
o__Burkholderiales
Other
o__Corynebacteriales
o__Micrococcales
o__Lactobacillales
o__Pasteurellales
o__Actinomycetales
o__Clostridiales
o__Fusobacteriales
o__Bacteroidales
Taxon
T(1W)
C(1W)
T(9W)
C(9W)

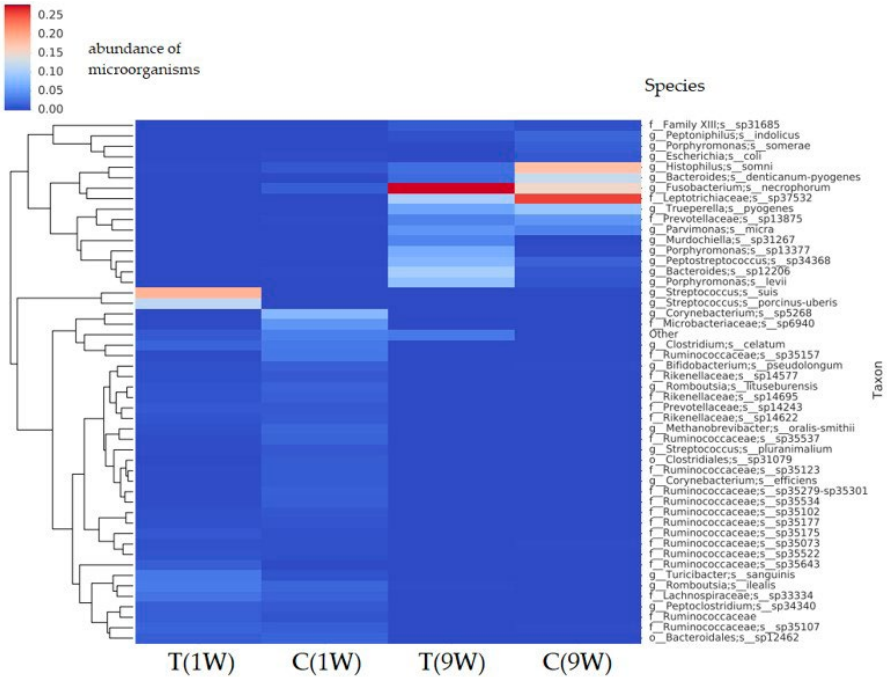


Figure 3.1.1.1. *Taxonomic composition of the uterine microbiota in beef cows according to treatment and postpartum sampling time*

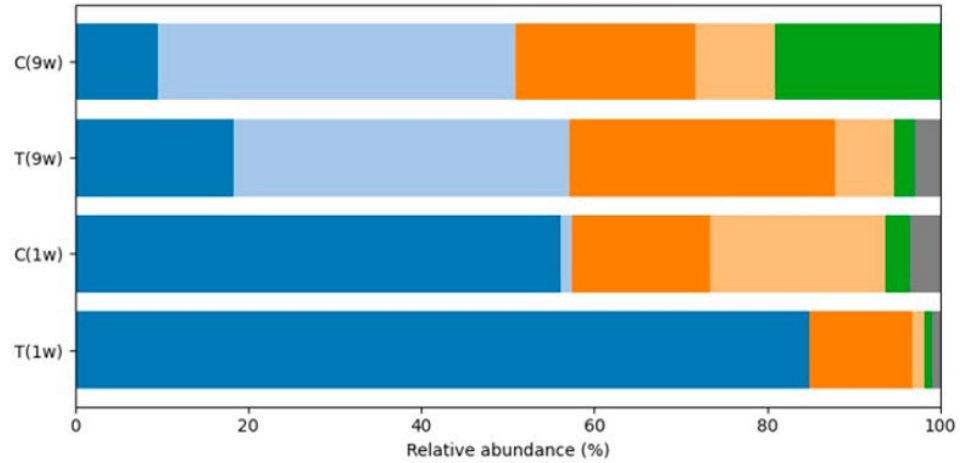
The treatment group was sampled at 1 week (T(1w)) and 9 weeks (T(9w)) postpartum, and the control group was sampled at the same time points (C(1w) and C(9w)). The microbiota is presented at the phylum, order, genus and species levels. The color scale represents relative abundance, ranging from dark red (highest abundance) to dark blue (lowest abundance). Each row corresponds to a specific taxon, with taxonomic identifiers shown on the right. Samples were hierarchically clustered using Bray–Curtis dissimilarity. Taxon names ending with alphabetic suffixes indicate polyphyletic groups.

Data from Figure 3.1.1.1 revealed a distinct distribution of bacteria at the phylum level across all four sampling categories defined by treatment and postpartum time. The uterine microbiota of cows sampled at 1 week postpartum, both in the treatment (T (1w)) and control (C (1w)) groups, was dominated by *Firmicutes*, whereas samples collected at 9 weeks postpartum from both the treatment (T (9w)) and control (C (9w)) groups were dominated by *Fusobacteria*. Differences in bacterial composition were also evident at the order level. *Clostridiales* and *Lactobacillales* were prevalent in the treatment group at 1 week *postpartum* (T (1w)), while *Clostridiales* predominated in the control group at the same time point (C (1w)). In contrast, *Fusobacteriales* and *Bacteroidales* were most frequently detected in the treatment group at 9 weeks *postpartum* (T (9w)), whereas *Fusobacteriales* dominated in the control group at 9 weeks postpartum (C (9w)).

To further characterize differences in microbiota composition, taxonomic analysis was extended to the species level. *Streptococcus* species predominated in the treatment group sampled at 1 week *postpartum* (T (1w)), while *Corynebacterium* was the most abundant genus in the corresponding control group (C (1w)). At 9 weeks *postpartum*, the uterine microbiota of the treatment group (T (9w)) was dominated by *Fusobacterium* species, whereas samples from the control group (C (9w)) showed a higher relative abundance of *Leptotrichiaceae, Histophilus*, and *Fusobacterium* taxa.

3.1.1.1. Analysis of the phylum–level structure of the uterine bacterial microbiota in beef cows

The composition of the uterine bacterial microbiota in beef cows at the phylum level, comparing the treatment and control groups at two sampling time points, is presented in Fig. 3.1.1.1.1.



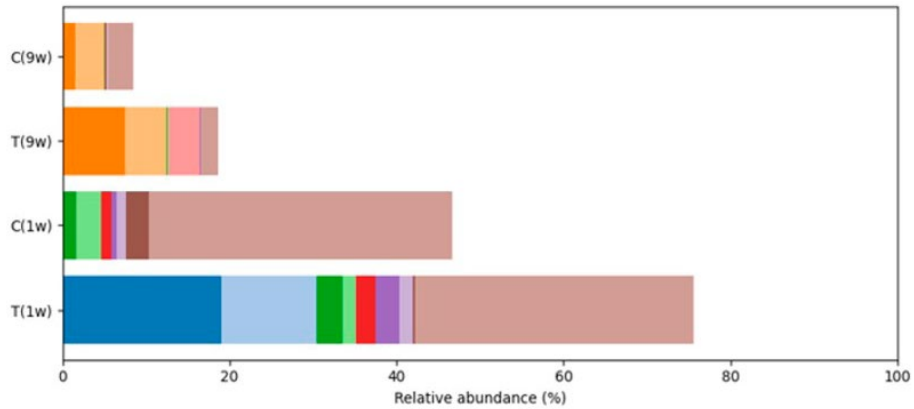
Taxonomy	Total	Groups			
		T(1w)	C(1w)	T(9w)	C(9w)
● *Firmicutes*	40.9	82.3	53.5	18.4	9.5
● *Fusobacteria*	20.3	0.0	1.2	38.8	41.2
● *Bacteroidetes*	19.6	11.6	15.2	30.7	20.8
● *Actinobacteria*	9.2	1.4	19.3	6.9	9.1
● *Proteobacteria*	6.3	0.8	2.7	2.4	19.1
● Other species	1.8	0.9	3.3	2.9	0.0

Figure 3.1.1.1.1. *Comparison of bacterial phyla composition in the uterine microbiota of beef cows across experimental groups*

T(1w)—treatment group at 1 week postpartum; C(1w)—control group at 1 week postpartum; T(9w)—treatment group at 9 weeks postpartum; C(9w)—control group at 9 weeks postpartum. Values represent the relative abundance (%) of individual bacterial phyla.

Based on the analysis, five predominant bacterial phyla were identified in the uterine microbiota of beef cows: *Firmicutes* (40.9%), *Fusobacteria* (20.3%), *Bacteroidetes* (19.6%), *Actinobacteria* (9.2%), and *Proteobacteria* (6.3%). In total, 605 bacterial species were detected in the uterine microbiota, reflecting a high level of taxonomic diversity across all experimental groups.

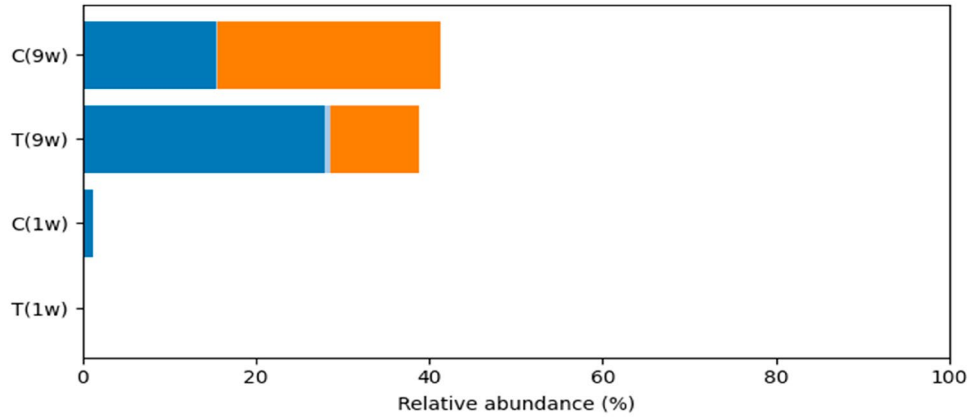
The relative abundance of the most frequently detected species belonging to the most abundant bacterial phyla is presented in Figs. 3.1.1.1.2–3.1.1.1.6. These figures show the taxonomic affiliation of these microorganisms, their potential functional significance, and their distribution among the different study groups.



Taxonomy	Total	Groups			
		T(1w)	C(1w)	T(9w)	C(9w)
S. Suis	4.8	19.0	0	0	0.1
S. Porcinus-uberis	2.9	11.5	0	0	0
S. Sp34368	2.2	0	0	7.5	1.4
S. Micra	2.1	0	0	4.9	3.5
S. Ilealis	1.2	3	1.7	0.2	0.1
S. Celatum	1.1	1.6	2.9	0.1	0
S. Sp33334	1	2.4	1.3	0	0.1
S. Sp31267	0.9	0	0	3.7	0
S. Sanguinis	0.9	2.9	0.6	0.1	0.1
S. Sp35107	0.7	1.6	1.1	0	0.2
S. Sp35157	0.7	0.2	2.7	0	0
S. Indolicus	0.6	0.1	0	0.5	1.7
Other species	11.3	33.3	36.4	1.6	1.3

Figure 3.1.1.1.2. *Comparison of the relative abundance of Firmicutes species (% of total bacterial composition) in beef cows*

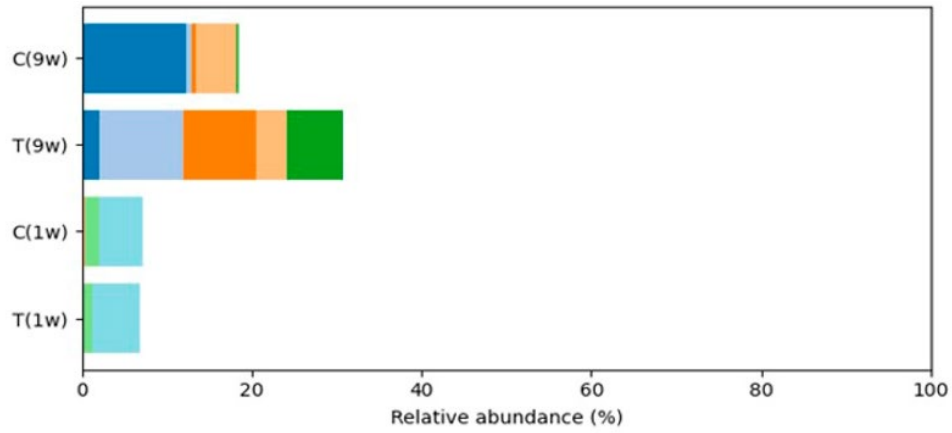
T(1w)—treatment group at 1 week postpartum; C(1w)—control group at 1 week postpartum; T(9w)—treatment group at 9 weeks postpartum; C(9w)—control group at 9 weeks postpartum.



Taxonomy	Total	Groups			
		T(1w)	C(1w)	T(9w)	C(9w)
● *S. Necrophorum*	11.1	0	1.2	27.9	15.4
● *S. Sp37444*	0.2	0	0	0.7	0.1
● *S. sp37532*	9	0	0	10.2	25.8

Figure 3.1.1.1.3. *Comparison of the relative abundance of Fusobacteria species (% of total bacterial composition) in beef cows*

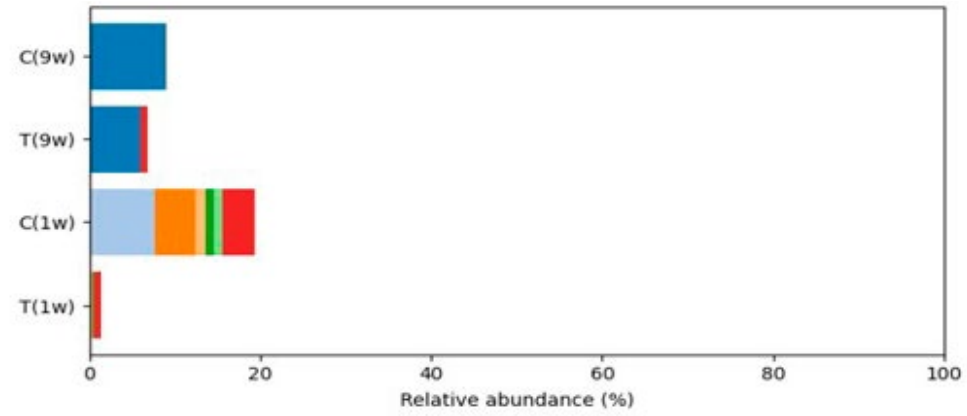
T(1w)—treatment group at 1 week postpartum; C(1w)—control group at 1 week postpartum; T(9w)—treatment group at 9 weeks postpartum; C(9w)—control group at 9 weeks postpartum.



Taxonomy	Total	Groups			
		T(1w)	C(1w)	T(9w)	C(9w)
S. Denticannum-pyogenes	3.6	0	0	2	12.2
S. Sp12206	2.7	0	0.2	10	0.7
S. Levii	2.3	0	0	8.5	0.5
S. Sp13875	2.1	0	0.2	3.6	4.8
S. Sp13377	1.7	0	0	6.6	0.2
S. Sp12462	0.7	1.2	1.6	0	0.1
Other species	2.8	5.7	5.1	0	0.1

Figure 3.1.1.1.4. *Comparison of the relative abundance of Bacteroidetes species (% of total bacterial composition) in beef cows*

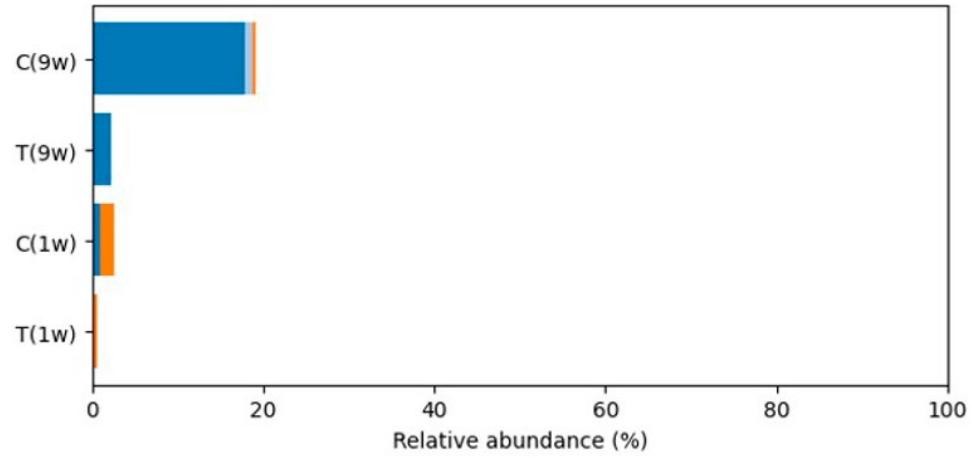
T(1w)—treatment group at 1 week postpartum; C(1w)—control group at 1 week postpartum; T(9w)—treatment group at 9 weeks postpartum; C(9w)—control group at 9 weeks postpartum.



Taxonomy	Total	Groups			
		T(1w)	C(1w)	T(9w)	C(9w)
• *S. Pyogenes*	3.8	0	0	6	9
• *S. Sp5268*	1.9	0	7.6	0	0
• *S. Sp6940*	1.2	0	4.8	0	0
• *S. Pseudolongum*	0.4	0.4	1.2	0	0.1
• *S. Efficiens*	0.3	0.1	1	0	0
• *S. Pseudotuberculosis-Ulcerans-Vitaerumini*	0.2	0	0.9	0	0
• Other species	1.4	0.9	3.8	0.9	0

Figure 3.1.1.1.5*. Comparison of the relative abundance of Actinobacteria species (% of total bacterial composition) in beef cows*

T(1w)—treatment group at 1 week postpartum; C(1w)—control group at 1 week postpartum; T(9w)—treatment group at 9 weeks postpartum; C(9w)—control group at 9 weeks postpartum.



Taxonomy	Total	Groups			
		T(1w)	C(1w)	T(9w)	C(9w)
• *S. Somni*	5.2	0.1	0.9	2.2	17.8
• *S. coli*	0.3	0.1	0.1	0	0.9
• Other species	0.4	0.4	1.6	0.1	0.4

Figure 3.1.1.1.6*. Comparison of the relative abundance of Proteobacteria species (% of total bacterial composition) in beef cows*

T(1w)—treatment group at 1 week postpartum; C(1w)—control group at 1 week postpartum; T(9w)—treatment group at 9 weeks postpartum; C(9w)—control group at 9 weeks postpartum.

Analysis of bacterial species belonging to the phylum *Firmicutes* revealed marked differences in their composition among the study groups (Fig. 3.1.1.1.2). In the T (1 week) group, *Streptococcus suis* (19.0%) and *Streptococcus porcinus–uberis* (11.5%) predominated, whereas in the other groups, the relative abundance of these species was very low or they were not detected.

In the C (1 week) group, *Clostridium celatum* (2.9%), *Lactobacillus ilealis* (1.7%), and several unidentified species belonging to the order *Clostridiales* (*Sp33334 and Sp35107*) showed the highest relative abundance. In contrast, considerably lower abundances of bacteria belonging to the phylum *Firmicutes* were detected in the T (9 weeks) and C (9 weeks) groups, with only individual representatives of *L. ilealis, C. sanguinis*, and other taxa being identified at relative abundances of 0.1–0.2%.

Analysis of bacteria belonging to the phylum *Fusobacteria* revealed an uneven distribution among the study groups (Fig. 3.1.1.1.3). In the T (9 weeks) and C (9 weeks) groups, *Fusobacterium necrophorum* predominated,

accounting for 27.9% and 15.4% of the total microbiota, respectively. *Fusobacterium sp37532* was also characterized by a high relative abundance, accounting for 10.2% of the microbiota in the T (9 weeks) group and 25.8% in the C (9 weeks) group. *Fusobacterium sp37444* was detected only in small amounts (up to 0.7%) in the T (9 weeks) group, whereas bacteria belonging to the phylum *Fusobacteria* were almost absent in the T (1 week) and C (1 week) groups

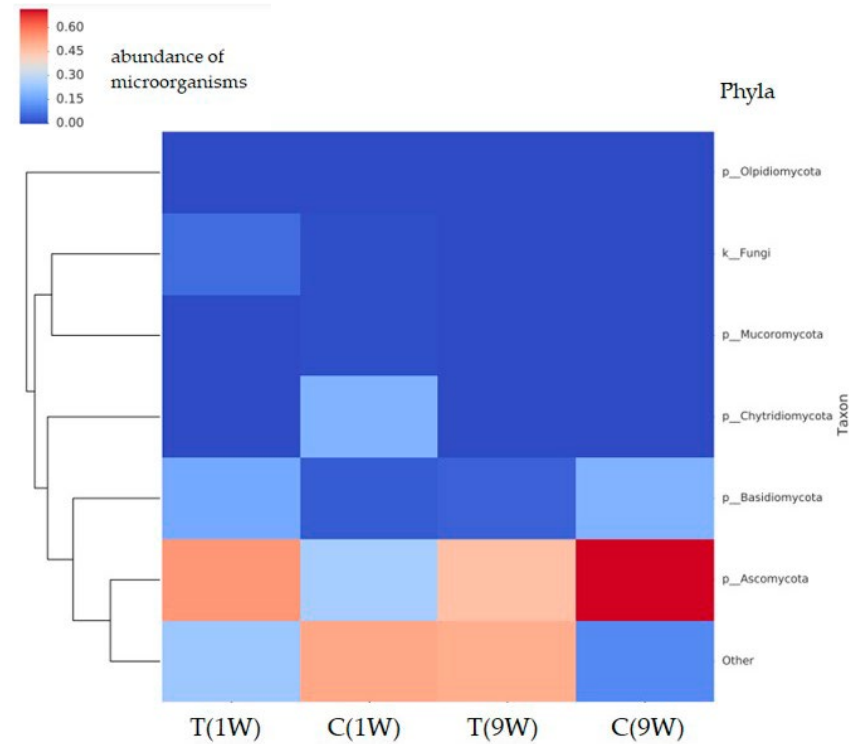
Evaluation of the distribution of bacteria belonging to the phylum *Bacteroidetes* showed that they were detected only in the T (9 weeks) and C (9 weeks) groups (Fig. 3.1.1.1.4), whereas in the T (1 week) and C (1 week) groups they were either not detected or were present at levels below the detection limit. In the C (9 weeks) group, *Bacteroides denticanum–pyogenes* predominated, accounting for 12.2% of the total microbiota. In addition to this species, *Sp13875* (4.8%), *Sp12206* (0.7%), and *Bacteroides levii* (0.5%) were identified. In the T (9 weeks) group, the most abundant taxa were *Sp12206* (10.0%), *Bacteroides levii* (8.5%), and *Sp13875* (3.6%).

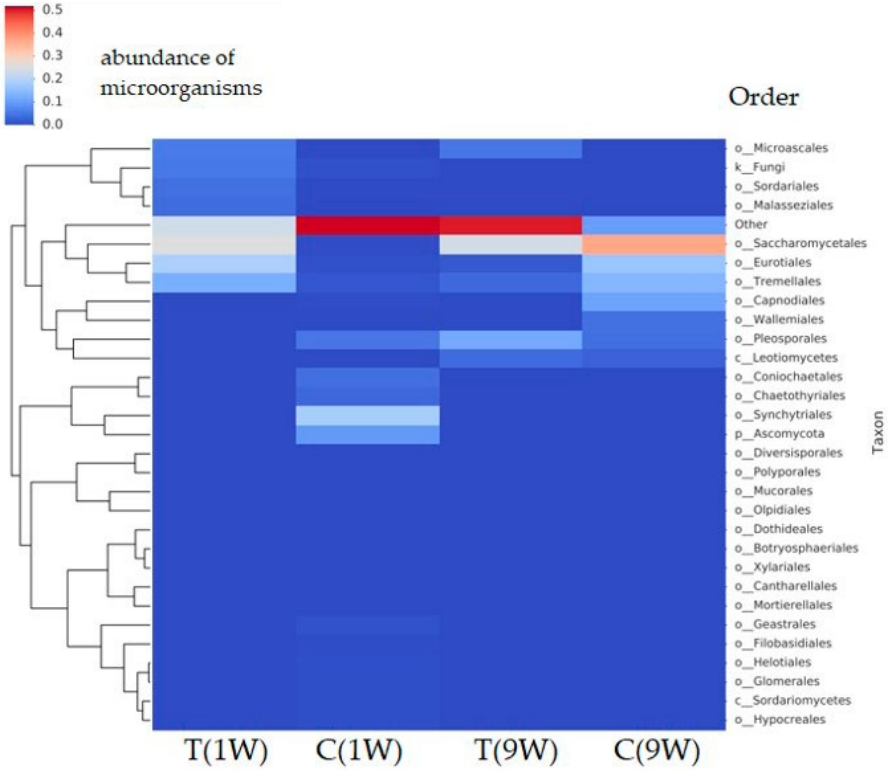
Analysis of bacteria belonging to the phylum *Actinobacteria* revealed differences in their composition among the study groups (Fig. 3.1.1.1.5). In the C (1 week) group, two unidentified species, *Sp5268* (7.6%) and *Sp6940* (4.8%), showed the highest relative abundance, followed by *Bifidobacterium pseudolongum* (1.2%) and *Bifidobacterium efficiens* (1.0%). In the T (9 weeks) and C (9 weeks) groups, *Trueperella pyogenes* predominated, accounting for 6.0% and 9.0% of the total microbiota, respectively. In the T (1 week) group, bacteria belonging to the phylum *Actinobacteria* were detected at very low abundances, with only *B. pseudolongum* (0.4%) and *B. efficiens* (0.1%) being identified

The distribution of bacteria belonging to the phylum Proteobacteria is presented in Fig. 3.1.1.1.6. The highest relative abundance of this phylum was observed in the C (9 weeks) group, where *Histophilus somni* predominated, accounting for 17.8% of the total microbiota. In the T (9 weeks), C (1 week), and T (1 week) groups, the relative abundance of this species was considerably lower, at 2.2%, 0.9%, and 0.1%, respectively. *Escherichia coli* was detected in all study groups; however, its relative abundance was low (0.0–0.9%).

3.1.2. Fungal composition of the uterine microbiota in beef cows

Fungal compositions at the phylum, order, and species levels of uterine microbiotas of beef cows are presented in Figure 3.2.1.1.


0.60
0.45
0.30
0.15
0.00
abundance of
microorganisms
Phyla
p__Olpidiomycota
k__Fungi
p__Mucoromycota
p__Chytridiomycota
p__Basidiomycota
p__Ascomycota
Other
Taxon
T(1W)
C(1W)
T(9W)
C(9W)


0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
abundance of
microorganisms
Order
o__Microascales
k__Fungi
o__Sordariales
o__Malasseziales
Other
o__Saccharomycetales
o__Eurotiales
o__Tremellales
o__Capnodiales
o__Wallemiales
o__Pleosporales
c__Leotiomycetes
o__Coniochaetales
o__Chaetothyriales
o__Synchytriales
p__Ascomycota
o__Diversisporales
o__Polyporales
o__Mucorales
o__Olpidiales
o__Dothideales
o__Botryosphaeriales
o__Xylariales
o__Cantharellales
o__Mortierellales
o__Geastrales
o__Filobasidiales
o__Helotiales
o__Glomerales
c__Sordariomycetes
o__Hypocreales
Taxon
T(1W)
C(1W)
T(9W)
C(9W)

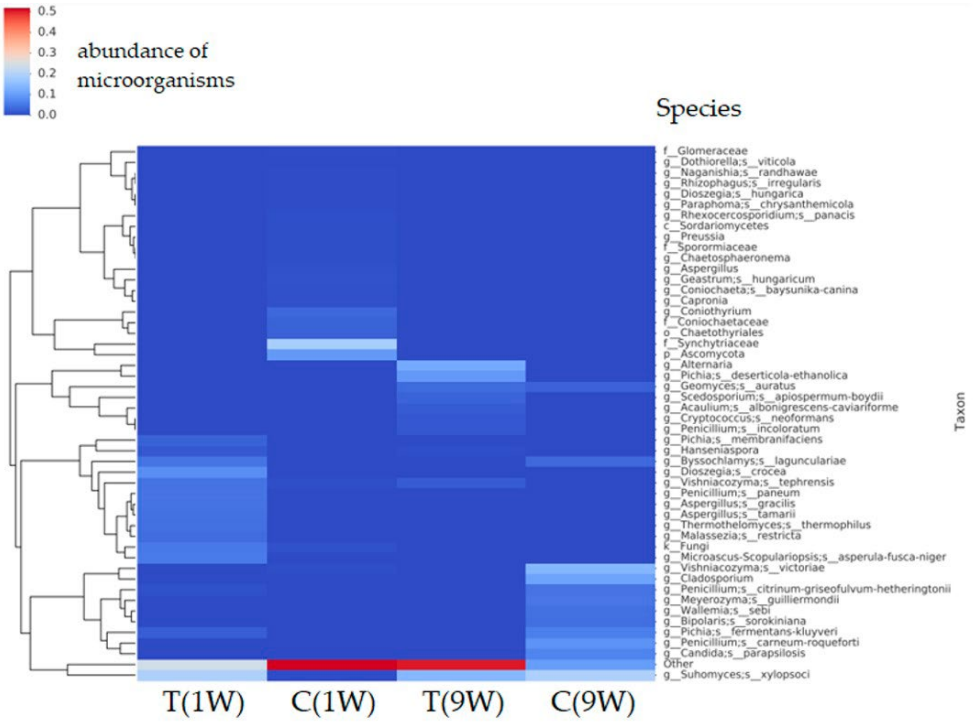


Fig. 3.1.2.1*. Composition of the uterine microbiota in beef cows according to treatment group and postpartum sampling time (T(1w), C(1w), T(9w), and C(9w))*

The microbiota is presented at the phylum, order, genus and species levels. Color intensity indicates relative abundance, ranging from dark red (highest) to dark blue (lowest). Each row represents a taxon, with taxonomic identifiers shown on the right. Samples were hierarchically clustered using Bray–Curtis dissimilarity. Taxon names ending with alphabetic suffixes indicate polyphyletic groups.

The heatmap of fungal taxa at the order level revealed clear differences in fungal community composition across cow groups. Notably, *Saccharomycetales* was the most dominant fungal order, particularly in Group C(1w), where it displayed the highest relative abundance (deep red), followed by moderate representation in Group T(9w) and minimal presence in Group C(9w). This group specific increase indicates that, in the uterine environment of Group C(1w) animals, these fungi may have proliferated more actively or become more firmly established. Group T(1w) exhibited a relatively low abundance across most taxa, with slight signals from *Microascales, Sordariales,* and *Eurotiales*. In contrast, Group C(9w) displayed generally low richness and evenness at the order level, lacking strong representation of any specific order.

Other notable orders included *Eurotiales, Tremellales*, and *Sordariales*, which showed moderate to low abundances in Groups T(1w) and T(9w). *Malasseziales* and *Capnodiales* were also observed, but at lower frequencies, indicating a secondary role in the overall community structure.

The "Other" category showed varying levels across groups, suggesting the presence of less–characterized or low–abundance taxa that may still contribute to functional dynamics within the uterine mycobiome.

The heatmap analysis of fungal taxa at the phylum level revealed distinct compositional differences among the experimental groups. In total, 83 taxon were identified, several of which showed marked variation in relative abundance across groups. The most dominant phylum across all groups was *Ascomycota*, showing highest relative abundance in Group C(9w), followed by Groups T(9w), C(1w), and T(1w). Notably, Group C(9w) exhibited the most intense signal (dark red), indicating a pronounced *Ascomycota* dominance in this group.

Basidiomycota was also present in all groups, with slightly higher abundance in Group C(9w) compared to the others, although its overall representation remained lower than that of Ascomycota.

Chytridiomycota and *Mucoromycota* were observed primarily in Groups C(1w) and T(9w), suggesting possible group specific colonization or environmental exposure. Olpidomycota and unclassified fungal sequences (e.g., k. Fungi) showed minimal repre–sentation, limited to Group T(1w).

The "Other" category, comprising low–abundance or poorly classified taxa, was most pronounced in Groups 2 and 3, indicating higher overall.

These findings suggest that *Ascomycota* is the core fungal phylum in the bovine uterus, while other phyla such as *Basidiomycota, Chytridiomycota*, and *Mucoromycota* contribute to group specific variation, potentially influenced by physiological, environmental, or treatment related factors.

Species level analysis of the uterine fungal microbiota revealed highly differentiated profiles among the cow groups. The genus *Suhomyces*, particularly *S. xylopsoci*, was the most dominant species, showing the highest relative abundance in Groups C(1w) and T(9w), with notable presence in Group T(1w) and minimal representation in Group C(9w). This consistent dominance suggests that *S. Xylopsoci* may serve as a core species within the uterine mycobiome of certain individuals.

Group T(1w) showed a moderate variety of species, including *Penicillium paneum, Aspergillus Tamarii,* and *Vishniacozyma Tephrensis,* indicating a stable fungal environment likely influenced by endogenous microbial dynamics. Group C(1w), in contrast, showed increased richness in species such as *Pichia deserticola–ethanolica*, *Geomyces Auratus*, and *Scopulariopsis*

apiospermum–boydii, suggesting possible environmental colonization or *postpartum* microbial expansion.

Group T(9w) exhibited a diverse but transitional profile, characterized by moderate levels *of Penicillium citrinum–griseofulvum–hetheringtonii, Candida parapsilosis*, and *Pichia fermentans–kluyveri*, possibly indicating a shift toward opportunistic fungal colonization. Group C(9w), by contrast, showed relatively low species diversity and abundance, with the exception of *Suhomyces xylopsoci*, which remained detectable at lower levels.

Interestingly, several potentially pathogenic or environmental fungi—including *Cryptococcus neoformans, Cladosporium, Malassezia restricta*, *and Aspergillus gracilis*—were sporadically present across groups, though not dominant. Their low–level presence may reflect transient colonization or suppressed growth under specific uterine conditions.

Overall, the species level distribution patterns reflect both stable and dynamic aspects of the bovine uterine mycobiome, influenced by group–specific factors such as immune status or metabolic conditions.

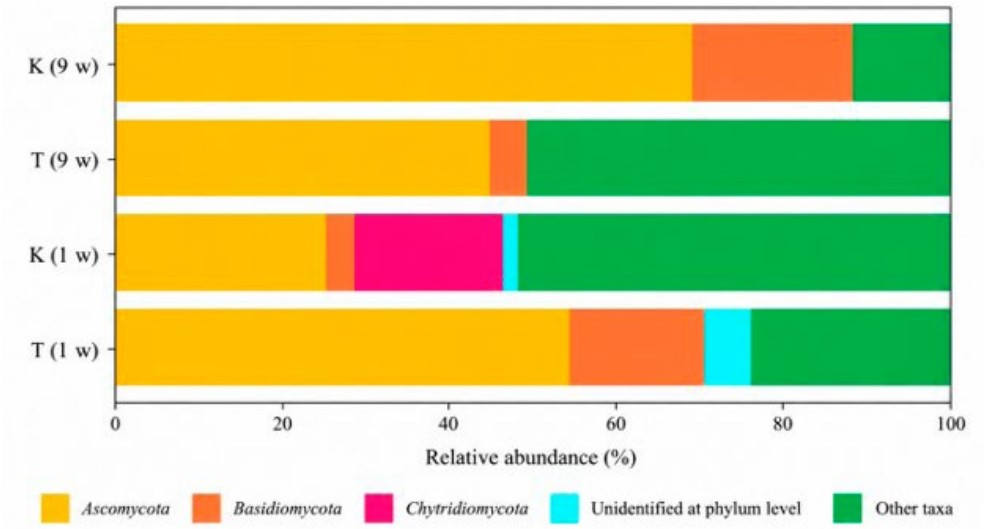
3.1.2.1. Analysis of the taxonomic composition of the uterine mycobiota in beef cows

Fungi belonging to the phylum *Ascomycota* predominated in all study groups. In addition to *Ascomycota*, fungi belonging to the phylum *Basidiomycota* were detected in all groups, with the highest relative abundance observed in the K (9 w) group. The highest relative abundance of *Chytridiomycota* was observed in the K (1 w) group.

The relative abundance of the "Other taxa" category was highest in the K (1 w) and T (9 w) groups, accounting for 51.6% and 50.3%, respectively. In the T (1 w) group, the relative abundance of this category was 23.8%, whereas in the K (9 w) group it was 10.1%.

Overall, the uterine mycobiota of beef cows was dominated by three fungal phyla: *Ascomycota* (49.4%), *Basidiomycota* (10.3%), and *Chytridiomycota* (4.6%), which together accounted for 64.3% of the total mycobiota

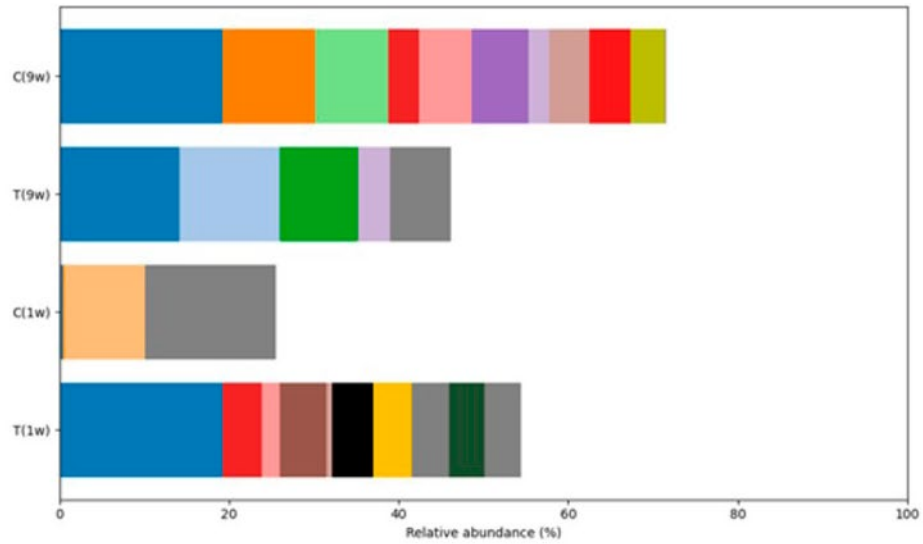
Overall, the results showed that three fungal phyla predominated in the uterine mycobiota of beef cows: *Ascomycota* (49.4%), *Basidiomycota* (10.3%), and *Chytridiomycota* (4.6%) (Fig. 3.1.2.1.1).



Taxon	Overall (%)	Groups (%)			
		T (1 w)	K (1 w)	T (9 w)	K (9 w)
Ascomycota	49.4	54.5	25.6	46.1	71.6
Basidiomycota	10.3	16.4	2.8	3.6	18.3
Chytridiomycota	4.6	0.0	18.6	0.0	0.0
Unidentified at phylum level	1.5	5.3	0.8	0.0	0.0
Other taxa	33.9	23.8	51.6	50.3	10.1

Figure 3.1.2.1.1. *Comparison of fungal genera of uterine microbiotas of beef cows. Only genera with a relative abundance ≥1% in at least one group are presented*

Values in the table represent the percentage abundance of each genus. T(1w)—treatment group at 1 week postpartum; C(1w)—control group at 1 week postpartum; T(9w)—treatment group at 9 weeks postpartum; C(9w)—control group at 9 weeks postpartum.



Taxonomy	Total	Groups			
		T(1w)	C(1w)	T(9w)	C(9w)
● *S. Xylopsoci*	13.2	19.2	0.4	14.2	19.2
● *S. NA*	2.9	0	0	11.8	0
● *S. NA*	2.8	0	0.2	0	11
● *S. NA*	2.4	0	9.5	0	0
● *S. Deserticola-ethanolica*	2.3	0	0	9.3	0
● *S. Carneum-roqueforti*	2.1	0	0	0	8.6
● *S. Lagunculariae*	2.1	4.7	0	0	3.6
● *S. Fermentans-kluyveri*	2.1	2.1	0	0	6.2
● *S. Parapsilosis*	1.7	0	0	0	6.7
● *S. Auratus*	1.5	0	0	3.7	2.5
● *S. Asperula-fusca-niger*	1.4	5.5	0	0	0
● *S. Citrinum-griseofulvum-hetheringtonii*	1.3	0.7	0	0	4.7
● *S. Paneum*	1.2	4.8	0	0	0
● *S. Guilliermondii*	1.2	0	0	0	4.9
● *S. Gracilis*	1.1	4.5	0	0	0
● *S. Tamarii*	1.1	4.4	0	0	0
● *S. Sorokiniana*	1	0	0	0	4
● *S. Thermophilus*	1	4.2	0	0	0
● Other species	6.3	4.4	15.4	7.2	0.2

Figure 3.1.2.1.2. *Relative abundance of Ascomycota species (% of total fungal composition) in beef cows*

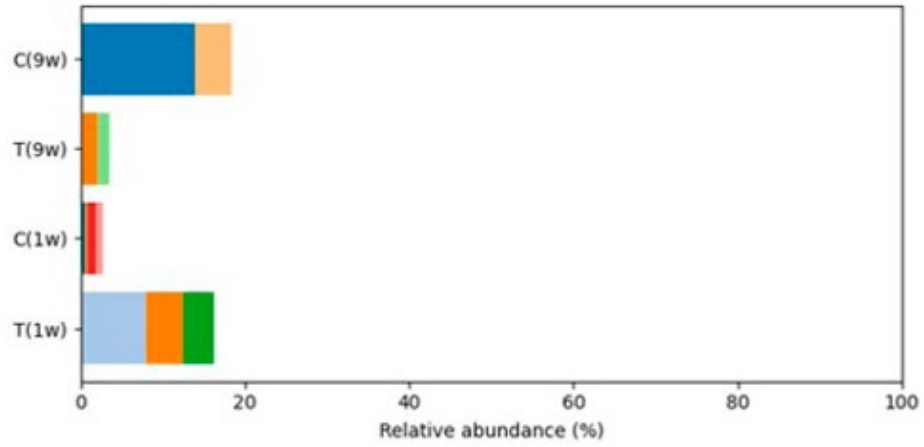
T(1w)—treatment group at 1 week postpartum; C(1w)—control group at 1 week postpartum; T(9w)—treatment group at 9 weeks postpartum; C(9w)—control group at 9 weeks postpartum.

In the T (1 w) group, *Suhomyces xylopsoci* (19.2%), *Aspergillus asperula–fusca–niger* (5.5%), *Penicillium paneum* (4.8%), *Aspergillus gracilis* (4.5%), *Aspergillus tamarii* (4.4%), and *Aspergillus thermophilus* (4.2%) showed relatively high abundances.

In the K (1 w) group, the highest relative abundance was observed for an unidentified taxon (9.5%), followed by *Pichia deserticola–ethanolica* (9.3%), *Penicillium carneum–roqueforti* (8.6%), and *Pichia fermentans–kluyveri* (6.2%).

In the T (9 w) group, *Suhomyces xylopsoci* showed the highest relative abundance (14.2%). *Scedosporium apiospermum–boydii* (3.0%), *Scedosporium albonigrescens–caviariforme* (1.8%), and *Penicillium incoloratum* (1.6%) were also detected.

In the K (9 w) group, the highest relative abundances were observed for *Suhomyces xylopsoci* (19.2%) and an unidentified taxon (11.0%). *Candida parapsilosis* (6.7%), *Candida guilliermondii* (4.9%), *Penicillium citrinum–griseofulvum–hetheringtonii* (4.7%), and *Pichia membranifaciens* (2.7%) were also detected.



Taxonomy	Total	Groups			
		T(1w)	C(1w)	T(9w)	C(9w)
S. Victoriae	3.6	0	0.5	0	14
S. Crocea	2	8	0	0	0
S. Tephrensis	1.7	4.5	0.4	2	0
S. Sebi	1.1	0	0	0	4.3
S. Restricta	1	3.8	0	0	0
S. Neoformans	0.4	0	0	1.6	0
S. Hungaricum	0.2	0	0.9	0	0
Other species	0.2	0	0.9	0	0

Figure 3.1.2.1.3. *Relative abundance of Basidiomycota species (% of total fungal composition) in beef cows*

T(1w)—treatment group at 1 week postpartum; C(1w)—control group at 1 week postpartum; T(9w)—treatment group at 9 weeks postpartum; C(9w)—control group at 9 weeks postpartum.

In the C (9 weeks) group, *Vishniacozyma victoriae* predominated, accounting for 14.0% of the total fungal community. *Vishniacozyma sebi* was detected exclusively in this group, with a relative abundance of 4.3%.

In the T (1 week) group, *Vishniacozyma crocea* (8.0%), *Vishniacozyma tephrensis* (4.5%), and *Malassezia restricta* (3.8%) showed the highest relative abundances.

In the T (9 weeks) group, *Vishniacozyma tephrensis* (2.0%) and *Cryptococcus neoformans* (1.6%) were the most frequently detected species.

In the C (1 week) group, fungi belonging to the phylum *Basidiomycota* were detected at low relative abundances. The most frequently detected species were *Rhodotorula hungarica* (0.9%), *Vishniacozyma victoriae* (0.5%), and *Vishniacozyma tephrensis* (0.4%).

3.2. Results of oxidative stress biomarker analysis

3.2.1. Glutathione peroxidase (GPx) analysis results

The dynamics of glutathione peroxidase (GPx) concentrations in the treatment and control groups during the study are presented in Fig. 3.2.1.1. In the control group, GPx concentration decreased consistently throughout the study, from 44.23 ± 16.09 ng/mL on the first day of the study to 21.34 ± 18.28 ng/mL on Day 62. In contrast, in the treatment group, after an initial concentration of 33.68 ± 24.31 ng/mL, an increase to 40.12 ± 27.16 ng/mL was observed on Day 21, followed by a slight decrease to 37.74 ± 19.66 ng/mL on Day 41 and a subsequent increase to 43.53 ± 22.36 ng/mL at the end of the study.

To evaluate the effects of group, study day, and their interaction on GPx concentration, a linear mixed model (LMM) was applied. The analysis showed that the group effect was not statistically significant ($F = 0.295$; $p = 0.600$). Similarly, no statistically significant effect of study day ($F = 0.631$; $p = 0.602$) or group × study day interaction ($F = 1.354$; $p = 0.281$) was observed.

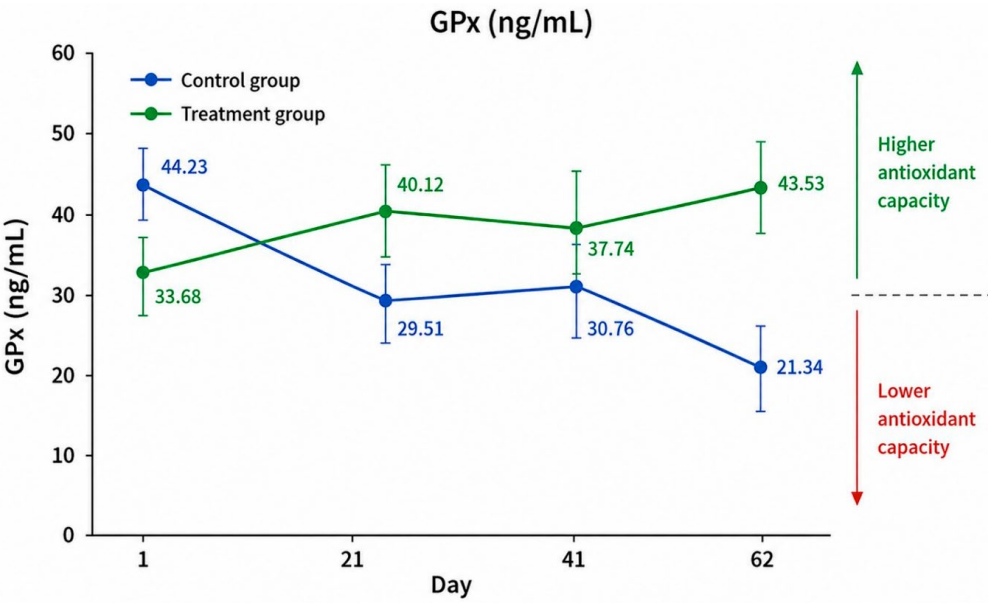


Figure 3.2.1.1. *Dynamics of glutathione peroxidase (GPx) concentration*

3.2.2. Superoxide dismutase (SOD) analysis results

Changes in superoxide dismutase (SOD) concentrations in the control and treatment groups during the study period are presented in Fig. 3.2.2.1. SOD

concentrations were higher in the treatment group than in the control group throughout the study. At the beginning of the study, the SOD concentration was 55.21 ± 49.34 ng/mL in the control group and 83.70 ± 46.32 ng/mL in the treatment group. The highest values in the treatment group were observed on Days 21 and 41 (112.57 ± 108.26 ng/mL and 112.64 ± 127.39 ng/mL, respectively), while the concentration remained elevated at the end of the study (95.97 ± 45.50 ng/mL). The large standard deviations indicate considerable individual variability in the response of the animals.

To evaluate the effects of group, study day, and their interaction on SOD concentration, a linear mixed model (LMM) was applied. No statistically significant group effect was observed ($F = 2.688$; $p = 0.120$). Similarly, neither the effect of study day ($F = 0.237$; $p = 0.870$) nor the group × study day interaction effect ($F = 0.322$; $p = 0.809$) was statistically significant.

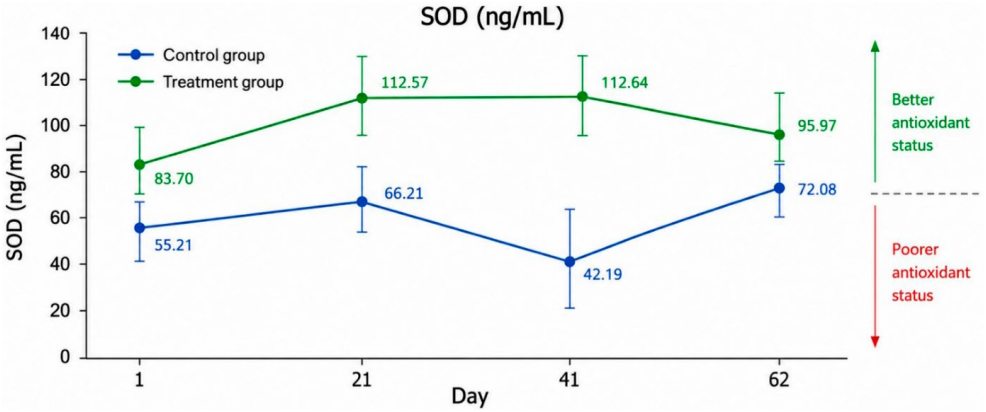


***Figure 3.2.2.1**. Dynamics of superoxide dismutase (SOD) concentration*

3.2.3. Malondialdehyde (MDA) analysis results

Changes in malondialdehyde (MDA) concentrations in the control and treatment groups during the study period are presented in Fig. 3.2.3.1. During the study, MDA concentrations decreased in both groups; however, a more pronounced decrease was observed in the treatment group. In the control group, MDA concentration decreased from 942.34 ± 362.24 ng/mL to 747.25 ± 263.99 ng/mL, whereas in the treatment group, it decreased from 1202.35 ± 609.48 ng/mL to 582.92 ± 212.68 ng/mL.

To evaluate the effects of group, study day, and their interaction on MDA concentration, a linear mixed model (LMM) was applied. The group effect was not statistically significant ($F < 0.001$; $p = 0.992$). A statistically significant effect of study day was observed ($F = 3.167$; $p = 0.043$); however, the group

× study day interaction effect was not statistically significant (F = 0.939; p = 0.437).

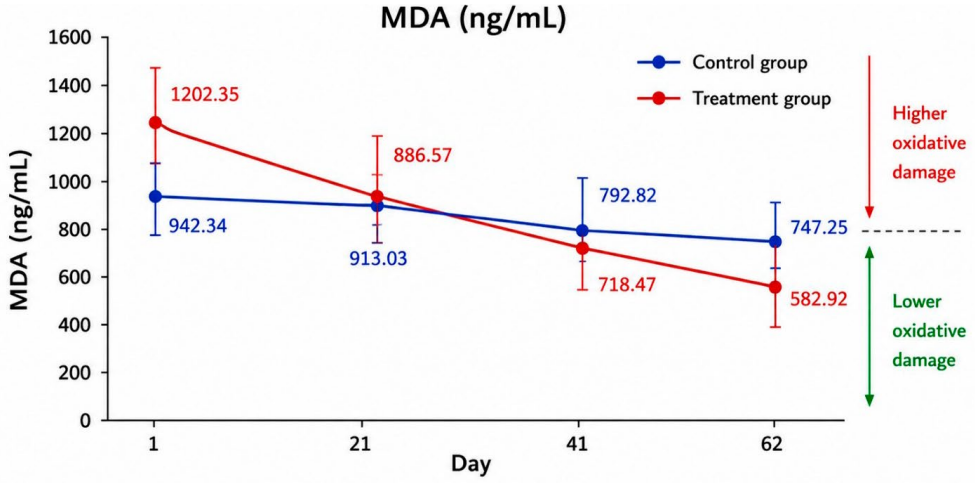


Figure 3.2.3.1. *Dynamics of malondialdehyde (mda) concentration*

3.3. Analysis of the time to first estrus

The use of grape extract boluses had a statistically significant effect on the time to first postpartum estrus ($F_{1,17} = 4.56$; $p = 0.048$; partial $\eta^2 = 0.21$) (Table 3.3.1).

Table 3.3.1*. Effects of grape extract boluses and reproductive period on physiological and reproductive parameters*

Parameter	Model	Group (p)	Interaction (p)	Effect size (η^2)
Days to estrus	GLM	0.048	—	0.21
Estradiol	LMM	0.437	0.767	—
Progesterone	GLM	0.893	—	—
Estrus index	LMM	0.117	0.050	—
Mean temperature (7 d)	GLM	0.531	—	—
Activity	GLM	0.367	—	—
Reticulorumen temp	LMM	0.231	0.362	—
Eye temperature	GLM	0.685	—	—
Vulvar temp 3C	GLM	0.176	—	0.147
Vulvar temp 2C	LMM	0.498	0.522	—
Vulvar temp 1C	LMM	0.673	0.917	—

Note: LMM—linear mixed model; GLM—generalized linear model; η^2—partial eta squared; $p < 0.05$ considered statistically significant.

Kaplan–Meier analysis revealed statistically significant differences between the control (C) and treatment (T) groups in the time to first postpartum estrus (Fig. 3.3.1). Cows in the treatment group exhibited their first estrus earlier than those in the control group. Differences between the groups were evaluated using the log–rank (Mantel–Cox) test.

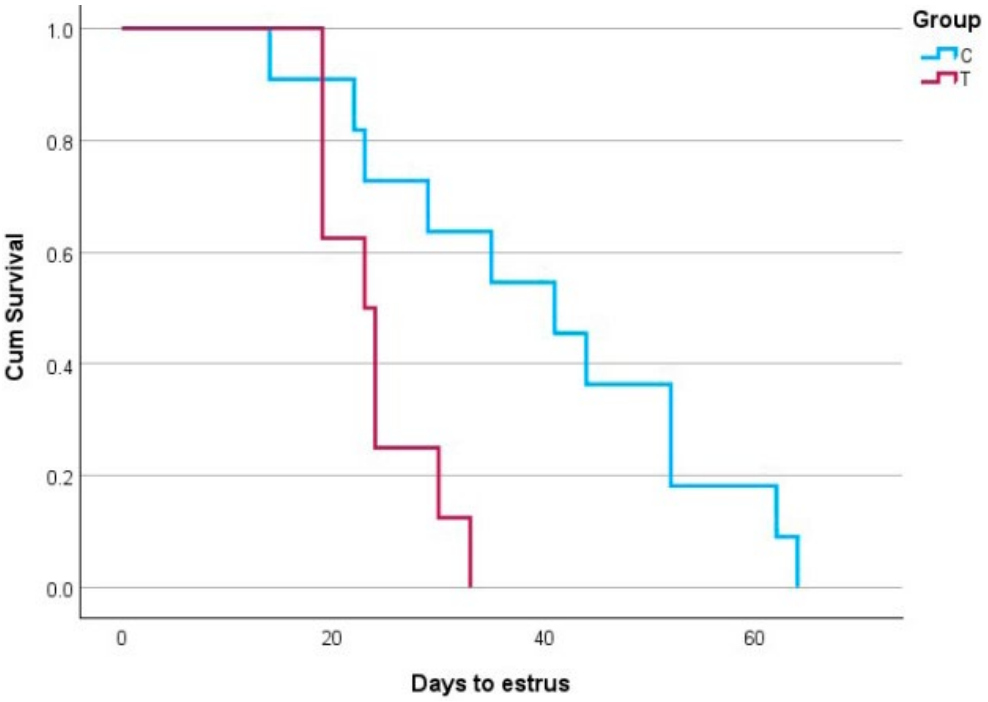


Figure 3.3.1. *Kaplan–Meier curves for time to first postpartum estrus in the control (C) and treatment (T) groups*

The mean interval from calving to first estrus was 23.88 ± 1.86 days in the treatment group and 39.82 ± 5.05 days in the control group. The median time to first estrus was 23.0 days (95% CI: 18.38–27.62) and 41.0 days (95% CI: 24.82–57.18), respectively.

The log–rank (Mantel–Cox) test confirmed a statistically significant difference between the groups ($\chi^2 = 6.642$; $p = 0.010$), indicating that cows receiving grape extract boluses reached first postpartum estrus significantly earlier.

3.4. Effect of grape extract supplementation on reproductive parameters

The evaluation of the effect of grape extract supplementation showed that supplementation had no statistically significant effect on reticulorumen temperature, animal activity, ocular and vulvar surface temperatures, or serum estradiol and progesterone concentrations ($p > 0.05$).

For the estrus index, a group × reproductive period interaction reached the threshold of statistical significance ($p = 0.050$), indicating a possible effect of grape extract supplementation on changes in this parameter.

3.5. Pregnancy rate results

The pregnancy rate was higher in the treatment group (88.9%) than in the control group (66.7%) (Fig. 3.5.1). Although the difference between the groups was relatively pronounced, statistical significance was not reached due to the small sample size.

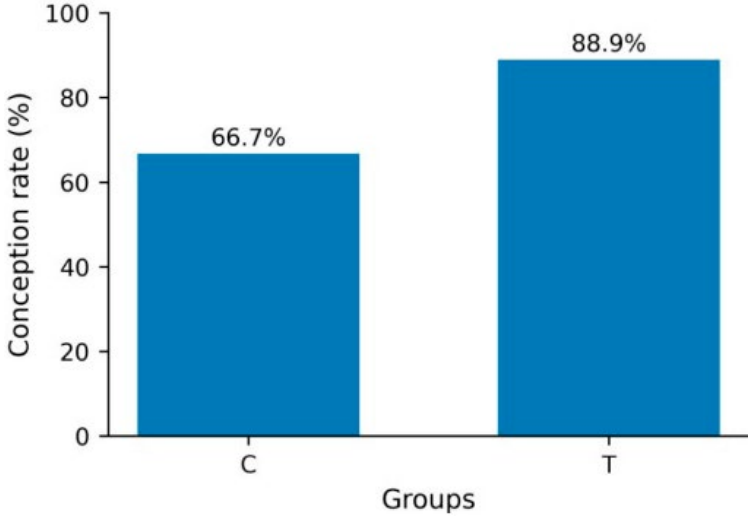


Figure 3.5.1. *Comparison of pregnancy rates between the control (C) and treatment (T) groups*

3.6. Correlation analysis

After applying the Benjamini–Hochberg false discovery rate (FDR) correction, only statistically significant correlations ($q < 0.05$) were selected for further analysis (Table 3.5.1). Statistically significant associations were

identified among reticulorumen temperature, animal activity, estrus index, and thermographically measured vulvar and ocular surface temperatures.

Table 3.6.1. *Statistically significant correlations among physiological and behavioral parameters after Benjamini–Hochberg FDR correction*

Parameters	Control group (r)	q-value	Treatment group (r)	q-value
Vulvar temperature—Eye temperature	0.37–0.50	<0.05	0.43–0.52	<0.05
Rumen temperature—Activity	0.72	<0.001	0.48	<0.05
Rumen temperature—Estrus index	0.75	<0.001	0.60	<0.05
Activity—Estrus index	0.65	<0.001	0.66	<0.001

Note: r – Pearson's correlation coefficient; q-values were calculated using the Benjamini–Hochberg false discovery rate (FDR) correction.

Reticulorumen temperature was positively associated with animal activity in both groups. A higher correlation coefficient was observed in the control group ($r = 0.72$; $q < 0.001$) than in the treatment group ($r = 0.48$; $q < 0.05$). A similar association was observed between reticulorumen temperature and the estrus index. In the control group, the correlation coefficient was $r = 0.75$ ($q < 0.001$), whereas in the treatment group it was $r = 0.60$ ($q < 0.05$). Thus, increases in reticulorumen temperature were accompanied by higher activity and estrus index values.

Activity was also positively correlated with the estrus index. The strength of this association was very similar in both groups: $r = 0.65$ ($q < 0.001$) in the control group and $r = 0.66$ ($q < 0.001$) in the treatment group. Among all the relationships analysed, the associations among reticulorumen temperature, activity, and the estrus index were the most consistently observed in both groups. This pattern of results indicates that behavioural changes and changes in internal temperature recorded during estrus occurred in parallel.

Analysis of the thermographically assessed parameters revealed positive associations between vulvar and ocular surface temperatures in both groups. In the control group, the correlation coefficients ranged from $r = 0.37$ to 0.50 ($q < 0.05$), whereas in the treatment group they ranged from $r = 0.43$ to 0.52 ($q < 0.05$). Thus, changes in vulvar surface temperature were accompanied by changes in ocular surface temperature in the same direction.

4. DISCCUSION

With the advancement of molecular methods for microorganism identification, it has been established that a diverse microbial community also exists in the uterus of clinically healthy cattle. Its composition may vary depending on hormonal status, the local immune response, and the course of uterine involution [7,32,162–164]. Therefore, the mere presence of bacteria is not considered pathological; rather, the overall structure of the microbiota is more important [32,33]. For this reason, it was important in the present study to evaluate whether the polyphenols contained in dry grape extract could contribute to the development of a more favourable uterine microbiota during the postpartum period.

In the present study, five major phyla predominated in the uterine bacterial microbiota of clinically healthy cows in both groups: *Firmicutes* – 40.9%, *Fusobacteria* – 20.3%, *Bacteroidetes* – 19.6%, *Actinobacteria* – 9.2%, and *Proteobacteria* – 6.3%. A total of 605 bacterial species were identified, indicating high taxonomic diversity of the uterine microbiota. Santos et al., who investigated the uterine microbiota of healthy cows and cows with metritis and endometritis during the postpartum period, identified the same major bacterial phyla; however, their relative abundance and the structure of the microbiota depended on uterine health status. The authors found that the microbiota of cows with metritis was characterized by a higher relative abundance of *Fusobacteria* and *Bacteroidetes*, whereas the uterine microbiota of healthy cows exhibited greater bacterial diversity [33]. A similar trend was observed in subsequent studies, in which the relative abundance of *Bacteroidetes* in the uterus of healthy cows was approximately 10%, compared with more than 45% in cows with metritis, while bacteria of the genus *Fusobacterium* accounted for approximately 8% and 29.4% of the bacterial community, respectively.

The high number of bacterial species and the predominance of *Firmicutes* observed in our study are consistent with the greater taxonomic diversity characteristic of the uterine microbiota of clinically healthy cows. On the other hand, the relative abundances of *Fusobacteria* (20.3%) and *Bacteroidetes* (19.6%) indicate that the presence of these bacterial phyla, which are associated with uterine dysbiosis, is not in itself sufficient to characterize a pathological condition. Since all cows included in the present study were clinically healthy, the results confirm that assessment of uterine microbiota status should take into account not only the presence of individual bacterial phyla but also their relative abundance, microbiota diversity, and bacterial composition at lower taxonomic levels.

Similarly, Clemmons et al. found that the vaginal and uterine bacterial communities of cows were highly diverse and differed in both species diversity and the relative abundance of individual bacterial taxa [163]. Although bacteria belonging to the phylum *Firmicutes* predominated in both parts of the reproductive tract, the uterine microbiota contained a higher proportion of unidentified taxa and differed in the composition of certain genera and families compared with the vaginal microbiota. The authors emphasized that these differences in microbiota most likely reflect physiological characteristics of the reproductive tract and may be relevant to reproductive status and early pregnancy [163]. Pascottini et al. also demonstrated clear dynamics of the postpartum uterine microbiota and showed that bacterial communities change during uterine involution in both clinically healthy cows and cows with endometritis [164]. In a study in which the uterine microbiota of Holstein cows was analysed by 16S rRNA gene sequencing at 10, 21, and 35 days postpartum, the microbiota composition was similar in clinically healthy cows and cows with subclinical endometritis, whereas cows with clinical endometritis exhibited lower bacterial diversity and pronounced dysbiosis. Furthermore, clinical endometritis was associated with a higher relative abundance of the phyla *Bacteroidetes* and *Fusobacteria* and bacteria of the genus *Trueperella*, while *Trueperella pyogenes* was the microorganism most frequently isolated by bacteriological examination.

The findings of our study emphasize that physiological changes occurring during the postpartum period must be taken into account when assessing the effects of different interventions on the uterine microbiota, because microbiota composition naturally changes during uterine involution. Although *Fusobacteria*, *Bacteroidetes*, and some bacteria belonging to the phylum *Actinobacteria*, including *Trueperella pyogenes*, are frequently associated with metritis and endometritis in the literature, their detection alone does not confirm uterine disease [32,162,164]. These microorganisms may also be detected in the uterus of clinically healthy cows, while the development of pathology depends on their abundance, interactions, and the cow's immune response. Galvão et al. emphasized that uterine diseases are most commonly associated with dysbiosis of the microbial community and the predominance of certain pathogenic taxa rather than their mere presence [32].

Certain differences in microbiota composition between the groups were also observed in our study. During the first week, *Streptococcus suis* and *Streptococcus porcinus–uberis* predominated in the treatment group, whereas *Clostridium celatum*, *Lactobacillus ilealis*, and other members of *Clostridiales* were detected in the control group. During the ninth week, *Fusobacterium* predominated in the treatment group, whereas the control group showed a more pronounced relative abundance of *Leptotrichiaceae*,

Histophilus, and *Fusobacterium* taxa. All cows included in the study were clinically and reproductively healthy; therefore, the detection of potentially pathogenic taxa is interpreted as part of the microbiota rather than as evidence of pathology per se.

One of the most important observations in our study was the difference in microbiota structure between the groups at nine weeks postpartum. Samples from cows receiving dry grape extract showed a higher relative abundance of bacteria associated with the genus *Lactobacillus*, whereas *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, and *T. pyogenes* were more prominent in samples from the control group. A higher relative abundance of *Lactobacillus* is considered a favourable feature of the microbiota of healthy cows. Molina Morales et al., discussing the possibilities of uterine microbiota modulation, noted that modification of microbial composition could become a promising strategy for the prevention of endometritis; however, clinical evidence in this field remains limited [30]. Therefore, our findings should be regarded as hypothesis–generating.

An important part of the present study was also the evaluation of the uterine fungal microbiota. Considerably less information is available on the mycobiota of the bovine reproductive tract than on bacterial communities. De Carli et al. reported that various fungi, including members of the genera *Candida*, *Penicillium*, and *Aspergillus*, may be detected in the bovine reproductive tract [8]; however, under certain conditions, they may be associated with endometritis, reproductive disorders, or reduced fertility [8,165–167]. Samples from cows receiving dry grape extract showed a lower relative abundance of some fungi, including taxa associated with the genus *Candida*, compared with the control group. This observation is consistent with the antimicrobial and microbiota–modulating properties of plant polyphenols; however, because pooled samples were used and the study was limited in scope, a causal relationship cannot be established. Furthermore, there are insufficient data to define the normal uterine mycobiota of beef cows at different stages of the postpartum period. Therefore, the lower relative abundance of fungi should be described as a potentially favourable trend.

In our study, the composition of the bacterial and fungal uterine microbiota of Angus beef cows changed during the postpartum period, reflecting the microbial community changes characteristic of this period. The dominant bacterial phyla and changes in their relative abundance were similar to the trends in postpartum bovine uterine microbiota described in previous studies [4,32,33,38,162,164,168–170]. Future studies should employ individual sampling, determination of absolute microbial abundance, and metagenomic or metatranscriptomic analyses, together with assessment of local inflammatory markers and individual reproductive parameters.

In the present study, the effect of dry grape (*Vitis vinifera*) extract on beef cows during the postpartum period was evaluated comprehensively by analysing the composition of the uterine bacterial and fungal microbiota, oxidative stress biomarkers, recovery of reproductive function, and sensor–recorded physiological and behavioural parameters. Such a study design is important because recovery of the reproductive system after calving is not the result of a single biological process. It is determined by uterine involution, regulation of local and systemic immune responses, metabolic adaptation, antioxidant defence status, activity of the hypothalamic–pituitary–ovarian axis, and changes in animal behaviour.

Glutathione peroxidase is one of the most important components of the enzymatic antioxidant system and is involved in the neutralization of hydrogen peroxide and lipid hydroperoxides. In the present study, the dynamics of GPx concentrations differed between the groups: in the control group, GPx concentration decreased from 44.23 ± 16.09 to 21.34 ± 18.28 ng/mL, i.e. by approximately 52%, whereas in the treatment group it increased from 33.68 ± 24.31 to 43.53 ± 22.36 ng/mL, i.e. by approximately 29%. Thus, opposite directions of change in GPx concentrations were observed in the two groups. Since GPx is an important component of enzymatic antioxidant defence, the increasing trend in GPx observed in the treatment group may indicate better maintenance of antioxidant system activity during the postpartum period, whereas the decrease observed in the control group may be associated with weakening enzymatic antioxidant defence. Nevertheless, statistical analysis did not confirm a significant group effect ($p = 0.600$) or group × time interaction ($p = 0.281$); therefore, the opposite GPx trajectories cannot be reliably attributed to the effect of dry grape extract. The high individual variability in GPx concentrations may also have influenced the statistical significance of the results.

Similar results were obtained by Huang et al. [107] in a study in which 48 early–lactation Holstein cows were supplemented with grape seed proanthocyanidin extract for 50 days. The cows were divided into four groups and received 0, 20, 40, or 80 mg of extract/kg body weight per day. Despite the different extract doses, no statistically significant effect on GPx activity was observed. No significant differences were found in SOD activity or total antioxidant capacity either. These findings are partly consistent with the results of the present study and indicate that supplementation with grape–derived polyphenols does not always result in statistically significant changes in the enzymatic antioxidant system.

Similar findings were also reported by Gessner et al. [103], who supplemented early–lactation Holstein cows with 1% grape seed and grape marc extract from three weeks before calving until the ninth week postpartum.

No significant effect of supplementation on hepatic GPX3 gene expression ($p = 0.192$) or supplement × time interaction ($p = 0.132$) was observed. No significant changes were detected in other indicators of antioxidant status either. These findings complement the results obtained in the present study and suggest that the effects of grape–derived products on the antioxidant system during the postpartum period may not be sufficiently pronounced to result in statistically significant changes in individual antioxidant parameters.

In another study involving younger cattle, more pronounced trends in the antioxidant response were observed. Weaned crossbred beef calves supplemented with 4 g of grape seed extract per day for 60 days had GSH–Px activity of 175.11 U/mL at the end of the study, compared with 162.38 U/mL in the control group. Although the difference did not reach statistical significance, a tendency towards higher GSH–Px activity was observed ($p = 0.078$). In the same study, SOD activity was significantly higher in calves receiving the extract (78.01 vs. 73.17 U/mL; $p = 0.010$), total antioxidant capacity was higher (6.46 vs. 5.79 U/mL; $p = 0.047$), and MDA concentration was lower (4.59 vs. 5.37 nmol/mL; $p = 0.027$) than in control calves.

Thus, the literature, as well as the results of the present study, indicates that the effects of grape–derived polyphenols on the enzymatic antioxidant system are not uniform. The opposite GPx trajectories observed in our study—an increase in the treatment group and a decrease in the control group—may indicate a possible association between dry grape extract and better–maintained enzymatic antioxidant defence. However, the absence of a statistically significant group × time interaction does not allow this change to be considered a confirmed effect of the extract. Differences among studies may be related to the composition and polyphenol concentration of the grape product used, their bioavailability, dose, duration of supplementation, animal age, physiological status, and initial intensity of oxidative stress.

Superoxide dismutase (SOD) is one of the major components of the enzymatic antioxidant system, catalysing the conversion of superoxide radicals into hydrogen peroxide and thereby contributing to the protection of cells against oxidative damage. In our study, SOD concentrations were numerically higher in the treatment group than in the control group at all evaluated time points. At the beginning of the study, the concentrations were 83.70 ± 46.32 and 55.21 ± 49.34 ng/mL, respectively. Although no statistically significant group effect ($p = 0.120$) or group × time interaction ($p = 0.809$) was detected, the consistently higher SOD concentrations observed throughout the study in the treatment group may be regarded as a biological trend.

Similarly, Li et al., who studied 30 Angus bulls, found no statistically significant effect of grape pomace on SOD activity [171]. The animals

were divided into three groups in which 0, 10, or 20% of the corn silage dry matter was replaced with dried grape pomace. SOD activity was 13.77 U/mL in the control group, 14.34 U/mL in the 10% grape pomace group, and 14.06 U/mL in the 20% group; the differences among groups were not statistically significant ($p = 0.681$). However, catalase activity was significantly higher in the 10% grape pomace group (29.39 U/mL) than in the control (13.22 U/mL) and 20% grape pomace (7.25 U/mL) groups ($p = 0.004$). This indicates that the effects of grape–derived products on the antioxidant system may not necessarily be reflected by simultaneous changes in all antioxidant enzymes.

In contrast, Ürkmez and Biricik reported a more pronounced effect of grape seed extract on SOD in a study involving 60 heat–stressed Holstein calves [108]. The calves received 0, 25, 50, or 100 mg/kg body weight per day of grape seed extract. SOD concentrations were significantly higher in calves receiving 50 and 100 mg/kg of the extract than in the control and 25 mg/kg groups ($p < 0.001$). In addition, MDA concentrations were lower in all extract–supplemented groups ($p < 0.01$), while total antioxidant capacity on Day 33 was higher in calves receiving 100 mg/kg than in the control group ($p = 0.02$).

A similar positive response was reported by other authors who investigated 30 weaned crossbred beef calves [172]. Following supplementation with 4 g of grape seed extract per day for 60 days, SOD activity at the end of the study was 78.01 U/mL in the treatment group and 73.17 U/mL in the control group, and the difference was statistically significant ($p = 0.010$). In addition, total antioxidant capacity was higher (6.46 vs. 5.79 U/mL; $p = 0.047$), whereas MDA concentration was lower (4.59 vs. 5.37 nmol/mL; $p = 0.027$) in calves receiving the extract. Thus, the literature reports inconsistent SOD responses to grape–derived products. In the study by Li et al. involving adult Angus bulls, as in the present study, no statistically significant change in SOD was observed, whereas studies involving growing or heat–stressed calves demonstrated significant increases in SOD following grape seed extract supplementation. These differences may be associated with animal age and physiological status, intensity of oxidative stress, the form of grape product used, polyphenol concentration, dose, and duration of supplementation. Therefore, the consistently higher SOD concentrations observed in the treatment group in the present study may indicate a more favourable antioxidant status; however, because the group effect and group × time interaction were not statistically significant, this cannot be regarded as a confirmed effect of dry grape extract.

Malondialdehyde (MDA) is formed during the peroxidation of polyunsaturated fatty acids; therefore, its concentration is used to assess

the intensity of oxidative lipid damage. In the present study, MDA concentrations decreased in both groups, although the numerical decrease was more pronounced in the treatment group. In the control group, MDA concentration decreased from 942.34 ± 362.24 to 747.25 ± 263.99 ng/mL, i.e. by approximately 21%, whereas in the treatment group it decreased from 1202.35 ± 609.48 to 582.92 ± 212.68 ng/mL, i.e. by approximately 52%. These dynamics indicate a reduction in the intensity of lipid peroxidation during the study period, while the more pronounced numerical decrease in the treatment group may be regarded as a favourable trend in oxidative status.

Nevertheless, only the overall effect of time was statistically significant ($p = 0.043$), whereas the group effect ($p = 0.992$) and group × time interaction ($p = 0.437$) were not significant. Therefore, it cannot be concluded that the more pronounced decrease in MDA concentration in the treatment group was caused by dry grape extract.

The ability of grape–derived products to reduce lipid oxidation has also been demonstrated in other studies involving cattle, although different biological samples were evaluated. Ianni et al. investigated 10 Friesian cows whose diet was supplemented for 56 days with dried grape pomace constituting 10% of dietary dry matter [173]. The authors found that inclusion of grape pomace in the diet improved the oxidative stability of products manufactured from the milk of these cows. Lipid oxidation was assessed using thiobarbituric acid–reactive substances (TBARS), with MDA used as a marker of oxidative lipid damage. A more pronounced protective effect was observed after 30 days of cheese ripening. The authors attributed this effect to the polyphenolic compounds present in grape pomace and their antioxidant properties.

In another study, supplementation of the diet of finishing Jersey × Holstein crossbred cattle with a high proportion of grape pomace also reduced lipid oxidation. The study included 24 cattle receiving a diet containing grape pomace. After slaughter, MDA concentrations were assessed in the *Longissimus lumborum* and *Semimembranosus* muscles. No differences between groups were observed during the first days of storage; however, on Days 4, 6, and 8 of storage, MDA concentrations were significantly lower in the meat of cattle receiving grape pomace than in the control group, and a significant diet × storage time interaction was observed ($p < 0.01$). This demonstrated greater oxidative stability of meat lipids in cattle receiving grape pomace.

The results of these studies are not directly equivalent to those obtained in the present study because Ianni et al. evaluated oxidative stability in dairy products, while in the study involving finishing cattle, MDA was measured in muscle tissue after slaughter, whereas in the present study MDA concentration was determined in blood serum. Nevertheless, a similar biological direction was observed across the studies: consumption of grape–derived products

containing polyphenols was associated with greater oxidative stability of lipids. The 52% reduction in MDA concentration observed in the treatment group in our study, compared with a 21% reduction in the control group, may be regarded as a numerical trend towards lower lipid peroxidation intensity. However, the absence of a statistically significant group × time interaction does not allow this change to be regarded as a confirmed effect of dry grape extract. Differences between the results of the present and previous studies may have been influenced by the form and polyphenol concentration of the grape product, dose, duration of supplementation, physiological status of the animals, and the biological sample in which lipid peroxidation was assessed.

The most important change observed in the present study was the shorter interval from calving to first estrus in cows receiving dry grape extract boluses. In the treatment group, first estrus occurred on average 23.88 ± 1.86 days postpartum, compared with 39.82 ± 5.05 days in the control group; thus, first estrus occurred on average 15.94 days earlier in the treatment group. The median time to first estrus was 23 and 41 days, respectively. Kaplan–Meier analysis confirmed a statistically significant difference between the groups ($\chi^2 = 6.642$; $p = 0.010$), and the group effect was also significant in the general linear model analysis ($p = 0.048$; partial $\eta^2 = 0.21$). This finding may be of practical importance because prolonged postpartum anestrus is one of the factors limiting reproductive efficiency in beef cows.

The effects of plant–derived bioactive compounds on postpartum reproductive parameters have also been investigated in other studies. Kumar et al., evaluating the effect of *Asparagus racemosus* root powder supplementation in crossbred cows, found that administration of this plant supplement before and after calving significantly shortened the interval to first postpartum estrus, shortened the service period, and reduced the number of inseminations per conception compared with the control group. In addition, cows receiving the supplement exhibited faster uterine involution [174]. Similar findings were reported by Amin et al. in cows diagnosed with ovarian dysfunction after calving. Their herbal preparation contained *Cyperus rotundus* tubers, *Moringa pterygosperma* leaves, *Zingiber officinale* rhizomes, and *Allium cepa* bulbs. Following the first administration of the preparation, an estrus response was observed in 66.7% of cows in the treatment group and, following the second administration, in 88.9%, compared with 20.0% in the control group. The conception rate was also higher in cows receiving the herbal preparation, at 66.7% compared with 20.0% in controls. These findings are partly consistent with the earlier occurrence of first estrus observed in cows receiving dry grape extract boluses in our study and suggest that the use of plant–derived bioactive compounds is associated with the resumption of reproductive activity after calving. However, direct comparison of these

studies is limited by differences in the composition of the plant products used, their doses, duration of supplementation, and the physiological status of the animals studied.

The pregnancy rate in the treatment group was also numerically higher, at 88.9%, compared with 66.7% in the control group. However, this difference was not statistically significant; therefore, it cannot be concluded that dry grape extract increased the pregnancy rate in cows. The small sample size limited the statistical power to detect differences between the groups. Nevertheless, the numerically higher pregnancy rate may be considered together with the significantly shorter interval to first estrus. The relationship between antioxidant status and fertility was demonstrated by Harrison et al. [175], who administered an injection of vitamin E and selenium to 198 cows three weeks before expected calving. The pregnancy rate following the first insemination was higher in supplemented cows than in controls, at 41.2% and 25.3%, respectively ($p = 0.02$), while the number of inseminations per conception was lower, at 2.3 and 2.8, respectively ($p = 0.03$). However, the interval to first estrus did not differ. This further demonstrates that different components of reproductive function may respond differently to changes in antioxidant status. Therefore, the pregnancy rates of 88.9% and 66.7% observed in our study should be regarded as a promising but statistically unconfirmed difference. A larger study would help determine whether the earlier resumption of the reproductive cycle in the treatment group is also associated with a greater probability of conception.

Although the interval to first estrus differed significantly between the groups, no group effect was observed for most other physiological and behavioural parameters. Animal activity did not differ significantly between the groups ($p = 0.367$). However, correlation analysis provided additional information on the relationships among individual parameters. Activity was positively correlated with the estrus index in both groups, with almost identical correlation coefficients: $r = 0.65$ ($q < 0.001$) in the control group and $r = 0.66$ ($q < 0.001$) in the treatment group. This association is biologically plausible because increased locomotor activity is one of the most characteristic behavioural changes during estrus. Silper et al., using two different automated activity monitoring systems in Holstein heifers, demonstrated that changes in activity can be used to detect and quantitatively assess estrus expression [176].

In the present study, the nearly identical correlation coefficients between activity and the estrus index in both groups are particularly important when interpreting the effect of the extract. Since the association was equally evident in both the control and treatment groups, it most likely reflects a general behavioural process characteristic of estrus rather than a specific effect of

dry grape extract. This is also consistent with the absence of a statistically significant overall group effect on activity.

No statistically significant group effect was observed for reticulorumen temperature either ($p = 0.231$); however, correlation analysis demonstrated associations with signs of estrus. In the control group, reticulorumen temperature correlated with activity at $r = 0.72$ ($q < 0.001$), compared with $r = 0.48$ ($q < 0.05$) in the treatment group. An even higher correlation coefficient was observed in the control group between reticulorumen temperature and the estrus index ($r = 0.75$; $q < 0.001$), whereas in the treatment group it was $r = 0.60$ ($q < 0.05$). Thus, in both groups, increases in reticulorumen temperature were accompanied by higher animal activity and estrus index values, although the strength of the associations differed between groups. Similar changes in temperature and estrus expression were reported by Burnett et al., who analysed 190 estrus episodes in dairy cows in which reticulorumen temperature and activity were recorded simultaneously [177]. The maximum positive temperature change during estrus was 0.55 ± 0.03 °C, while during the ovulation period it was 0.26 ± 0.04 °C. Furthermore, cows exhibiting more pronounced estrus expression showed greater temperature changes. This is consistent with the positive association of reticulorumen temperature with activity and the estrus index observed in our study. However, alerts generated solely on the basis of temperature changes in the study by Burnett et al. did not achieve sufficient accuracy for reliable detection of estrus or ovulation. Therefore, reticulorumen temperature may provide additional information on physiological changes occurring during estrus, but it is more appropriately evaluated together with behavioural parameters.

No statistically significant group effect was observed for ocular or vulvar surface temperatures (ocular: $p = 0.685$; vulvar: $p = 0.176$). However, correlation analysis of the thermographic parameters revealed positive associations between vulvar and ocular temperatures. In the control group, correlation coefficients ranged from $r = 0.37$ to 0.50, whereas in the treatment group they ranged from $r = 0.43$ to 0.52 ($q < 0.05$). This indicates that surface temperature changes recorded in different anatomical regions occurred to some extent in parallel. Talukder et al. investigated the potential of thermography for assessing reproductive status [178]. According to their findings, changes in vulvar surface temperature could be used to predict ovulation 24–48 h in advance. Using a threshold increase of 1.0 °C, the method achieved a sensitivity of 83%, specificity of 43%, and positive predictive value of 71%. However, the vulvar region has practical limitations because measurements may be affected by the tail and contamination; therefore, the ocular region is also considered a potential site for thermographic monitoring because it is more suitable for automated observation. The association between vulvar and

ocular temperatures observed in our study confirms that peripheral temperature changes are not entirely independent. Nevertheless, neither ocular nor vulvar temperature was significantly affected by group, and previous studies indicate limited accuracy of estrus diagnosis based on thermography alone. For this reason, thermographic parameters are more appropriately considered a supplementary rather than a stand–alone method for estrus detection.

Dry grape extract supplementation also had no statistically significant effect on estradiol or progesterone concentrations (estradiol: $p = 0.437$; progesterone: $p = 0.893$). This is important when interpreting the significantly earlier first estrus observed in the treatment group. Although the reproductive cycle resumed earlier in cows receiving the extract, the weekly blood sampling schedule may not have been frequent enough to capture short–term changes in estradiol associated with the preovulatory follicle. When summarizing the physiological and behavioural results, it is important that significant associations among these parameters were observed in both groups. Activity correlated with the estrus index, while reticulorumen temperature correlated with both activity and the estrus index. Thermographic analysis also revealed associations between vulvar and ocular surface temperatures. Since these relationships occurred in both the control and treatment groups, they most likely reflect general physiological and behavioural processes occurring during estrus rather than a specific effect of dry grape extract.

Taken together, these results support the importance of an integrated multiparametric approach. Saint–Dizier et al. reported in their review that integration of temperature and accelerometer data across different cattle breeds and housing systems enabled estrus detection accuracy exceeding 90% [179]. The use of multiple parameters also helps reduce the number of false alerts caused by changes in environmental temperature, interactions among animals, or increases in activity unrelated to estrus.

Thus, the associations among reticulorumen temperature, activity, the estrus index, and thermographic parameters observed in the present study indicate that these parameters may provide more information on reproductive status when evaluated together rather than separately. Although dry grape extract had no statistically significant effect on most individual physiological and hormonal parameters, the significantly earlier occurrence of first estrus in the treatment group suggests a possible association with faster resumption of reproductive activity after calving. Given the small sample size, both the potential effect of the extract on pregnancy rate and the diagnostic value of integrated physiological parameters should be confirmed in larger studies.

In summary, the results of this study demonstrate that cows receiving dry grape extract boluses exhibited their first postpartum estrus significantly earlier; however, the extract had no statistically significant effect on most

other reproductive, physiological, and oxidative stress parameters. Differences in uterine microbiota were observed between the treatment and control groups, together with potentially favourable trends in bacterial and fungal microbiota composition. Nevertheless, because the microbiota analysis was based on pooled samples, it cannot be conclusively determined whether these differences were directly associated with dry grape extract supplementation. Further studies using individual samples are therefore required to assess their biological and clinical significance.

CONCLUSIONS

1. The composition of the bacterial and fungal uterine microbiota of beef cows during the postpartum period varied depending on the sampling time. The bacterial microbiota was dominated by Firmicutes, Fusobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, and Proteobacteria, whereas the fungal microbiota was dominated by Ascomycota, Basidiomycota, and Chytridiomycota. Differences in microbiota composition observed between the treatment and control groups suggest possible associations with dry grape extract supplementation; however, due to the limited possibilities for statistical comparison of individual taxa, these differences cannot be considered statistically confirmed effects of the extract on the uterine microbiota.
    1.1. During the first week postpartum, bacteria of the phylum Firmicutes predominated in both groups, although their species composition differed. The treatment group was dominated by Streptococcus suis and S. porcinus–uberis, whereas Clostridium celatum and Lactobacillus ilealis predominated in the control group. In the fungal microbiota, Suhomyces xylopsoci predominated in the treatment group, together with fungi belonging to the genera Aspergillus and Penicillium, whereas representatives of the genera Pichia and Penicillium predominated in the control group.
    1.2. During the ninth week postpartum, differences in bacterial and fungal microbiota composition between the groups became more pronounced. The treatment group showed a lower relative abundance of Trueperella pyogenes and Histophilus somni, bacteria associated with uterine infections. In the fungal microbiota, Candida guilliermondii and C. parapsilosis were detected in the control group, whereas Suhomyces xylopsoci predominated in the treatment group, along with representatives of the genera Scedosporium and Penicillium. Considering the limited possibilities for statistical comparison of individual taxa, the observed differences between the

groups should be interpreted as trends in microbiota composition rather than as statistically confirmed effects of dry grape extract supplementation.

2. Dry grape extract supplementation had no statistically significant effect on the oxidative stress markers glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA). In the treatment group, GPx showed an increasing trend, SOD concentrations remained higher throughout the study, and MDA concentrations decreased more markedly than in the control group; however, these trends did not result in statistically significant differences between the groups. A statistically significant effect of time was observed for MDA concentration ($p = 0.043$), indicating a decrease over the study period irrespective of group.
3. When evaluating the associations of dry grape extract supplementation with reproductive, physiological, and hormonal parameters in beef cows during the postpartum period, the main statistically confirmed finding was a shorter interval to first estrus, whereas no statistically significant differences between the groups were found for the other evaluated parameters.
   3.1. Dry grape extract supplementation significantly shortened the interval from calving to first estrus. Cows in the treatment group exhibited their first estrus on average 15.94 days earlier than cows in the control group (23.88 ± 1.86 vs. 39.82 ± 5.05 days; $p = 0.010$).
   3.2. A trend toward a higher pregnancy rate was observed in the treatment group, with a pregnancy rate of 88.9% compared with 66.7% in the control group. However, the difference was not statistically significant; therefore, the higher pregnancy rate cannot be considered a confirmed effect of dry grape extract supplementation.
   3.3. Dry grape extract supplementation had no statistically significant effect on animal activity, reticulorumen temperature, eye surface and vulvar temperatures, or estradiol and progesterone concentrations. Therefore, an effect of the extract on the evaluated physiological and hormonal parameters was not confirmed.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Holroyd, R.G.; McGowan, M.R. 14 Reproductive management of beef cattle. *Beef cattle production and trade* 2014, 291.
2. Beam, S.W.; Butler, W.R. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol Reprod* 1997*, 56*, 133–142.
3. Sammad, A.; Khan, M.Z.; Abbas, Z.; Hu, L.; Ullah, Q.; Wang, Y.; Zhu, H.; Wang, Y. Major Nutritional Metabolic Alterations Influencing the Reproductive System of Postpartum Dairy Cows. *Metabolites* 2022*, 12*, DOI 10.3390/metabo12010060..
4. Adnane, M.; Chapwanya, A. A review of the diversity of the genital tract microbiome and implications for fertility of cattle. *Animals* 2022*, 12*, 460.
5. Çömlekcioğlu, U.; Jezierska, S.; Opsomer, G.; Pascottini, O.B. Uterine microbial ecology and disease in cattle: A review. *Theriogenology* 2024*, 213*, 66–78.
6. Galvão, K.N.; Bicalho, R.C.; Jeon, S.J. Symposium review: The uterine microbiome associated with the development of uterine disease in dairy cows. *J Dairy Sci* 2019*, 102*, 11786–11797.
7. Poole, R.K.; Soffa, D.R.; McAnally, B.E.; Smith, M.S.; Hickman–Brown, K.J.; Stockland, E.L. Reproductive microbiomes in domestic livestock: insights utilizing 16S rRNA gene amplicon community sequencing. *Animals* 2023*, 13*, 485.
8. Poole, R.K.; Pickett, A.T.; Oliveira Filho, R.V.; de Melo, G.D.; Palanisamy, V.; Dass, S.C.; Cooke, R.F.; Pohler, K.G. Shifts in uterine bacterial communities associated with endogenous progesterone and 17β–estradiol concentrations in beef cattle. *Domest Anim Endocrinol* 2023*, 82*, 106766.
9. Ault–Seay, T.B.; Moorey, S.E.; Mathew, D.J.; Schrick, F.N.; Pohler, K.G.; McLean, K.J.; Myer, P.R. Importance of the female reproductive tract microbiome and its relationship with the uterine environment for health and productivity in cattle: A review. *Frontiers in Animal Science* 2023*, 4*, 1111636.
10. De Carli, S.; Lopes, C.E.; Breyer, G.M.; Dias, M.E.; Saggin, B.F.; Varela, A.P.M.; Mayer, F.Q.; Siqueira, F.M. Cows' reproductive performances and parity order influences the cervicovaginal fungal community. *Microb Pathog* 2022*, 162*, 105351.
11. Pal, M.; Tariku, F.; Rebuma, T.; Seth, D.; Patel, K.B. Growing role of fungi in the reproductive disorders of animals. *Journal of Advances in Microbiology Research* 2024*, 5*, 37–42.
12. Saini, P.; Singh, M.; Kumar, P. Fungal endometritis in bovines. *Open veterinary journal* 2019*, 9*, 94–98.
13. Pascottini, O.B.; Van Schyndel, S.J.; Spricigo, J.W.; Rousseau, J.; Weese, J.S.; LeBlanc, S.J. Dynamics of uterine microbiota in postpartum dairy cows with clinical or subclinical endometritis. *Scientific reports* 2020*, 10*, 12353.
14. Bešlo, D.; Došlić, G.; Agić, D.; Rastija, V.; Šperanda, M.; Gantner, V.; Lučić, B. Polyphenols in Ruminant Nutrition and Their Effects on Reproduction. *Antioxidants* 2022*, 11*, DOI 10.3390/antiox11050970..
15. Eder, K.; Ringseis, R.; Gessner, D.K. Effects of grape by–products on oxidative stress and inflammation in farm animals: An overview of studies performed in pigs, chickens, and cattle. *Animals* 2025*, 15*, 1536.
16. Gessner, D.K.; Ringseis, R.; Eder, K. Potential of plant polyphenols to combat oxidative stress and inflammatory processes in farm animals. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2017*, 101*, 605–628.
17. Daddam, J.R.; Daniel, D.; Kra, G.; Pelech, I.; Portnick, Y.; Moallem, U.; Lavon, Y.; Zachut, M. Plant polyphenol extract supplementation affects performance, welfare,

and the Nrf2–oxidative stress response in adipose tissue of heat–stressed dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2023*, 106*, 9807, DOI 10.3168/jds.2023–23549..
18. Karastergiou, A.; Gancel, A.; Jourdes, M.; Teissedre, P. Valorization of grape pomace: A review of phenolic composition, bioactivity, and therapeutic potential. *Antioxidants* 2024*, 13*, 1131.
19. Rutten, C.J.; Velthuis, A.; Steeneveld, W.; Hogeveen, H. Invited review: Sensors to support health management on dairy farms. *J Dairy Sci* 2013*, 96*, 1928–1952.
20. Saint-Dizier, M.; Chastant-Maillard, S. Towards an automated detection of oestrus in dairy cattle. *Reproduction in domestic animals* 2012*, 47*, 1056–1061.
21. Džermeikaitė, K.; Bačėninaitė, D.; Antanaitis, R. Innovations in Cattle Farming: Application of Innovative Technologies and Sensors in the Diagnosis of Diseases. *Animals* 2023*, 13*, DOI 10.3390/ani13050780..
22. Michelena, Á; Fontenla–Romero, Ó; Luis Calvo–Rolle, J. A review and future trends of precision livestock over dairy and beef cow cattle with artificial intelligence. *Logic Journal of the IGPL* 2025*, 33*, jzae111.
23. Ferreira, C.; Todorovic, M.; Sugrue, P.; Teixeira, S.; Galvin, P. Emerging sensors and instrumentation systems for bovine health monitoring. *animal* 2025*, 19*, 101527.
24. Whitnall, T.; Pitts, N. Global trends in meat consumption. *Agricultural Commodities* 2019*, 9*, 96–99.
25. Holroyd, R.G.; McGowan, M.R. Reproductive management of beef cattle. 2014.
26. Jobirov, F.; Yuejie, Z.; Kibona, C.A. Evaluating profitability of beef cattle farming and its determinants among smallholder beef cattle farmers in the Baljovan District of Khatlon region, Tajikistan. *Plos one* 2022*, 17*, e0274391.
27. Willy, B.T.; Beyene, A.B.; Amare, D.M. The determinants of beef cattle market participation on beef cattle producers' welfare: A case study of West Shewa Zone, Oromia Region, Ethiopia. *Advances in Agriculture* 2023*, 2023*, 8822032.
28. Washaya, S.; Mudzengi, C.P.; Gobvu, V.; Mafigu, T.; Mutore, R. Postpartum anoestrus in extensively managed beef cows. *Theriogenology: Recent Advances in the Field* 2025*, 89*.
29. Mekuriaw, Y. Negative energy balance and its implication on productive and reproductive performance of early lactating dairy cows: review paper. *Journal of Applied Animal Research* 2023*, 51*, 220, DOI 10.1080/09712119.2023.2176859..
30. Roelofs, J.; López–Gatius, F.; Hunter, R.H.F.; Van Eerdenburg, F.J.C.M.; Hanzen, C.H. When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. *Theriogenology* 2010*, 74*, 327, DOI 10.1016/j.theriogenology.2010.02.016..
31. Roelofs, J.B.; Van Eerdenburg, F.; Soede, N.M.; Kemp, B. Various behavioral signs of estrous and their relationship with time of ovulation in dairy cattle. *Theriogenology* 2005*, 63*, 1366–1377.
32. Saint-Dizier, M.; Chastant-Maillard, S. Towards an automated detection of oestrus in dairy cattle. *Reproduction in domestic animals* 2012*, 47*, 1056–1061.
33. Severino Lendechy, V.H.; Montiel Palacios, F.; Ahuja Aguirre, C.C.; Gómez de Lucio, H.; Piñeiro Vázquez, A.T.; Chay Canul, A.J. Effect of restricted suckling and feed supplementation on postpartum follicular development and ovarian activity in beef cows. *Revista bio ciencias* 2020*, 7*.
34. Araújo, P.G.; Pizzelli, G.N.; Carvalho, M.R.d.; Meneguelli, C.A. Postpartum ovarian activity and uterine involution in crossbred dairy cattle. .
35. Butler, W.R. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livest Prod Sci* 2003*, 83*, 211–218.
36. Crowe, M.A.; Diskin, M.G.; Williams, E.J. Parturition to resumption of ovarian cyclicity: comparative aspects of beef and dairy cows. *Animal* 2014*, 8*, 40–53.

37. Diskin, M.G.; Kenny, D.A. Managing the reproductive performance of beef cows. *Theriogenology* 2016*, 86*, 379–387.
38. Bisinotto, R.S.; Greco, L.F.; Ribeiro, E.S.; Martinez, N.; Lima, F.S.; Staples, C.R.; Thatcher, W.W.; Santos, J. Influences of nutrition and metabolism on fertility of dairy cows. *Animal Reproduction (AR)* 2018*, 9*, 260–272.
39. Senger, P.L. Pathways to pregnancy and parturition. 2004.
40. Whisnant, C.S.; Kiser, T.E.; Thompson, F.N. Effect of calf removal on serum luteinizing hormone and cortisol concentrations in postpartum beef cows. *Theriogenology* 1985*, 24*, 119–129.
41. Yavas, Y.; Walton, J.S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. *Theriogenology* 2000*, 54*, 25–55.
42. Stagg, K.; Spicer, L.J.; Sreenan, J.M.; Roche, J.F.; Diskin, M.G. Effect of calf isolation on follicular wave dynamics, gonadotropin and metabolic hormone changes, and interval to first ovulation in beef cows fed either of two energy levels postpartum. *Biol Reprod* 1998*, 59*, 777–783.
43. Wiltbank, J.N.; Rowden, W.W.; Ingalls, J.E.; Geegoey, K.E.; Koch, R. Effect of energy level on reproductive phenomena of mature Hereford cows. *J Anim Sci* 1962*, 21*, 219–225.
44. Michael, J.D.; Baruselli, P.S.; Campanile, G. Influence of nutrition, body condition, and metabolic status on reproduction in female beef cattle: A review. *Theriogenology* 2019*, 125*, 277–284.
45. Stevenson, J.S.; Johnson, S.K.; Milliken, G.A. Incidence of postpartum anestrus in suckled beef cattle: treatments to induce estrus, ovulation, and conception. *The Professional Animal Scientist* 2003*, 19*, 124–134.
46. Molina Morales, N.; Sola Leyva, A.; Sáez Lara, M.J.; Plaza Díaz, J.; Romero, B.; Clavero Gilabert, A.; Mozas Moreno, J.; Fontes, J.; Altmae, S. New Opportunities for Endometrial Health by Modifying Uterine Microbial Composition: Present or Future? 2020.
47. Murga Valderrama, N.L.; Segura Portocarrero, G.T.; Romani Vasquez, A.C.; Frias Torres, H.; Flores Durand, G.J.; Cornejo Villanueva, V.G.; Del Solar, J.C.; Costa Polveiro, R.; da Silva Vieira, D.; Bardales Escalante, W. Exploring the microbiome of two uterine sites in cows. *Scientific reports* 2023*, 13*, 18768.
48. Santos, T.; Gilbert, R.O.; Bicalho, R.C. Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows. *J Dairy Sci* 2011*, 94*, 291–302.
49. Paiano, R.B.; Bonilla, J.; de Sousa, R.L.M.; Moreno, A.M.; Baruselli, P.S. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils against pathogens often related to cattle endometritis. *The journal of infection in developing countries* 2020*, 14*, 177–183.
50. Chen, S.; Zhu, Y.; Liu, Z.; Gao, Z.; Li, B.; Zhang, D.; Zhang, Z.; Jiang, X.; Liu, Z.; Meng, L. Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates diabetic bladder dysfunction via the activation of the Nrf2 pathway. *PLoS One* 2015*, 10*, e0126457.
51. Cheng, X.; Yang, S.; Xu, C.; Li, L.; Zhang, Y.; Guo, Y.; Zhang, C.; Li, P.; Long, M.; He, J. Proanthocyanidins protect against β–hydroxybutyrate–induced oxidative damage in bovine endometrial cells. *Molecules* 2019*, 24*, 400.
52. Miranda–CasoLuengo, R.; Lu, J.; Williams, E.J.; Miranda–CasoLuengo, A.A.; Carrington, S.D.; Evans, A.C.; Meijer, W.G. Delayed differentiation of vaginal and uterine microbiomes in dairy cows developing postpartum endometritis. *PloS one* 2019*, 14*, e0200974.
53. Missio, D.; Leivas, F.G.; Cibin, F.; Emanuelli, T.; Somacal, S.; Buss, V.; Gasperin, B.; Oliveira, D.E.d.; Gonçalves, P.B.D.; Ferreira, R. Vitamin E reduces the reactive

oxygen species production in dominant follicle during the negative energy balance in cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 2023*, 58*, 1662–1671.
54. Hagita, Y.; Miura, R.; Shirasuna, K.; Ajito, T.; Matsumoto, H. Effects of oxidative stress and antioxidant activity in plasma and uterine fluid during early postpartum on subsequent reproductive performance of Japanese Black cows. *Animals* 2025*, 15*, 767.
55. Prata, C.; Zalambani, C.; Rossi, F.; Rossello, S.; Cerchiara, T.; Cappadone, C.; Malucelli, E. Nutrients and nutraceuticals from vitis vinifera L. Pomace: biological activities, valorization, and potential applications. *Nutrients* 2025*, 17*, 583.
56. Magrone, T.; Magrone, M.; Russo, M.A.; Jirillo, E. Recent advances on the anti–inflammatory and antioxidant properties of red grape polyphenols: in vitro and in vivo studies. *Antioxidants* 2019*, 9*, 35.
57. Bocsan, I.C.; Măgureanu, D.C.; Pop, R.M.; Levai, A.M.; Macovei, ȘO.; Pătrașca, I.M.; Chedea, V.S.; Buzoianu, A.D. Antioxidant and anti–inflammatory actions of polyphenols from red and white grape pomace in ischemic heart diseases. *Biomedicines* 2022*, 10*, 2337.
58. Jomova, K.; Alomar, S.Y.; Valko, R.; Liska, J.; Nepovimova, E.; Kuca, K.; Valko, M. Flavonoids and their role in oxidative stress, inflammation, and human diseases. *Chem Biol Interact* 2025*, 413*, 111489.
59. Calabrese, V.; Cornelius, C.; Dinkova–Kostova, A.T.; Iavicoli, I.; Di Paola, R.; Koverech, A.; Cuzzocrea, S.; Rizzarelli, E.; Calabrese, E.J. Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Molecular Basis of Disease* 2012*, 1822*, 753–783.
60. Taladrid, D.; Rebollo–Hernanz, M.; Martin–Cabrejas, M.A.; Moreno–Arribas, M.; Bartolomé, B. Grape Pomace as a Cardiometabolic Health–Promoting Ingredient: Activity in the Intestinal Environment. *Antioxidants* 2023*, 12*.
61. Cheng, X.; Yang, S.; Xu, C.; Li, L.; Zhang, Y.; Guo, Y.; Zhang, C.; Li, P.; Long, M.; He, J. Proanthocyanidins protect against β–hydroxybutyrate–induced oxidative damage in bovine endometrial cells. *Molecules* 2019*, 24*, 400.
62. Liu, M.; Liu, S.; Lin, Z.; Chen, X.; Jiao, Q.; Du, X.; Jiang, H. Targeting the interplay between autophagy and the Nrf2 pathway in Parkinson's disease with potential therapeutic implications. *Biomolecules* 2025*, 15*, 149.
63. Lee, J.; Giordano, S.; Zhang, J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross–talk and redox signalling. *Biochem J* 2012*, 441*, 523–540.
64. Kim, H.; Montana, V.; Jang, H.; Parpura, V.; Kim, J. Epigallocatechin gallate (EGCG) stimulates autophagy in vascular endothelial cells: a potential role for reducing lipid accumulation. *J Biol Chem* 2013*, 288*, 22693–22705.
65. Pandey, P.; Lakhanpal, S.; Mahmood, D.; Kang, H.N.; Kim, B.; Kang, S.; Choi, J.; Choi, M.; Pandey, S.; Bhat, M. An updated review summarizing the anticancer potential of flavonoids via targeting NF–kB pathway. *Frontiers in pharmacology* 2025*, 15*, 1513422.
66. Saha, S.; Buttari, B.; Panieri, E.; Profumo, E.; Saso, L. An overview of Nrf2 signaling pathway and its role in inflammation. *Molecules* 2020*, 25*, 5474.
67. Kim, J.; Cha, Y.; Surh, Y. A protective role of nuclear factor–erythroid 2–related factor–2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2010*, 690*, 12–23.
68. Chuang, C.; McIntosh, M.K. Potential mechanisms by which polyphenol–rich grapes prevent obesity–mediated inflammation and metabolic diseases. *Annu Rev Nutr* 2011*, 31*, 155–176.
69. Yahfoufi, N.; Alsadi, N.; Jambi, M.; Matar, C. The immunomodulatory and anti–inflammatory role of polyphenols. *Nutrients* 2018*, 10*, 1618.
70. Gessner, D.K.; Fiesel, A.; Most, E.; Dinges, J.; Wen, G.; Ringseis, R.; Eder, K. Supplementation of a grape seed and grape marc meal extract decreases activities of

the oxidative stress–responsive transcription factors NF–κB and Nrf2 in the duodenal mucosa of pigs. *Acta Vet Scand* 2013*, 55*, 18.
71. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1831/2003 dėl priedų, skirtų naudoti gyvūnų mityboje. Europos Sąjungos oficialusis leidinys. 2003; L 268:29–43. Available online: https://eur–lex.europa.eu/legal–content/LT/ALL/?uri=celex%3A32003R1831.
72. Lavecchia, T.; Rea, G.; Antonacci, A.; Giardi, M.T. Healthy and adverse effects of plant–derived functional metabolites: the need of revealing their content and bioactivity in a complex food matrix. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2013*, 53*, 198–213.
73. Mei, H.; Li, Y.; Wu, S.; He, J. Natural plant polyphenols contribute to the ecological and healthy swine production. *Journal of animal science and biotechnology* 2024*, 15*, 146.
74. Boukrouh, S.; Noutfia, A.; Moula, N.; Avril, C.; Hornick, J.; Chentouf, M.; Cabaraux, J. Effects of sulla flexuosa hay as alternative feed resource on goat's milk production and quality. *Animals* 2023*, 13*, 709.
75. Al Rharad, A.; El Aayadi, S.; Avril, C.; Souradjou, A.; Sow, F.; Camara, Y.; Hornick, J.; Boukrouh, S. Meta–analysis of dietary tannins in small ruminant diets: Effects on growth performance, serum metabolites, antioxidant status, ruminal fermentation, meat quality, and fatty acid profile. *Animals* 2025*, 15*, 596.
76. Chen, J.; Huang, Z.; Cao, X.; Zou, T.; You, J.; Guan, W. Plant–derived polyphenols in sow nutrition: An update. *Animal Nutrition* 2023*, 12*, 96–107.
77. Zhang, H.; Tsao, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti–inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science* 2016*, 8*, 33–42.
78. Rajput, S.A.; Sun, L.; Zhang, N.; Khalil, M.M.; Ling, Z.; Chong, L.; Wang, S.; Rajput, I.R.; Bloch, D.M.; Khan, F.A. Grape seed proanthocyanidin extract alleviates aflatoxinB1–induced immunotoxicity and oxidative stress via modulation of NF–κB and Nrf2 signaling pathways in broilers. *Toxins* 2019*, 11*, 23.
79. Hashem, N.M.; Gonzalez–Bulnes, A.; Simal–Gandara, J. Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste? *Antioxidants* 2020*, 9*, DOI 10.3390/antiox9101023..
80. Statistics Department of the International Organisation of Vine and Wine (OIV) OIV Statistical Brief: Wine,Table Grapes & Dried Grapes in 2024. 2025 Available online: https://www.oiv.int/sites/default/files/documents/OIV_Statistical_Brief–Wine_Table_Grapes_and_Dried_Grapes_in_2024.
81. Blasi, F.; Trovarelli, V.; Mangiapelo, L.; Ianni, F.; Cossignani, L. Grape pomace for feed enrichment to improve the quality of animal–based foods. *Foods* 2024*, 13*, 3541.
82. Li, Y.; Shi, C.; Deng, J.; Qiu, X.; Zhang, S.; Wang, H.; Qin, X.; He, Y.; Cao, B.; Su, H. Effects of grape pomace on growth performance, nitrogen metabolism, antioxidants, and microbial diversity in Angus bulls. *Antioxidants* 2024*, 13*, 412.
83. Brenes, A.; Viveros, A.; Chamorro, S.; Arija, I. Use of polyphenol–rich grape by–products in monogastric nutrition. A review. *Anim Feed Sci Technol* 2016*, 211*, 1–17.
84. Costa, M.M.; Alfaia, C.M.; Lopes, P.A.; Pestana, J.M.; Prates, J.A. Grape by–products as feedstuff for pig and poultry production. *Animals* 2022*, 12*, 2239.
85. Ospina–Romero, M.A.; González–Ríos, H.; Barrera–Silva, M.Á; Valenzuela–Melendres, M.; Martínez–Téllez, M.Á; Pinelli–Saavedra, A. Winemaking by–products and grape polyphenols extracts as phytogenic feed additives in the pork production. Review. *Revista mexicana de ciencias pecuarias* 2024*, 15*, 669–699.
86. Ospina–Romero, M.A.; González–Ríos, H.; Barrera–Silva, M.Á; Valenzuela–Melendres, M.; Martínez–Téllez, M.Á; Pinelli–Saavedra, A. Winemaking by–products and grape polyphenols extracts as phytogenic feed additives in the pork production. Review. *Revista mexicana de ciencias pecuarias* 2024*, 15*, 669–699.

87. Tang, G.; Zhao, C.; Liu, Q.; Feng, X.; Xu, X.; Cao, S.; Meng, X.; Li, S.; Gan, R.; Li, H. Potential of grape wastes as a natural source of bioactive compounds. *Molecules* 2018*, 23*, 2598.
88. Bocsan, I.C.; Măgureanu, D.C.; Pop, R.M.; Levai, A.M.; Macovei, ȘO.; Pătrașca, I.M.; Chedea, V.S.; Buzoianu, A.D. Antioxidant and anti–inflammatory actions of polyphenols from red and white grape pomace in ischemic heart diseases. *Biomedicines* 2022*, 10*, 2337.
89. Pop, R.M.; Boarescu, P.; Bocsan, C.I.; Gherman, M.L.; Chedea, V.S.; Jianu, E.; Roșian, ȘH.; Boarescu, I.; Ranga, F.; Tomoiagă, L.L. Anti–inflammatory and antioxidant effects of white grape pomace polyphenols on isoproterenol–induced myocardial infarction. *International Journal of Molecular Sciences* 2025*, 26*, 2035.
90. Cangiano, L.R.; Zenobi, M.G.; Nelson, C.D.; Ipharraguerre, I.R.; DiLorenzo, N. A bioactive extract from Olea europaea protects newly weaned beef heifers against experimentally induced chronic inflammation. *J Anim Sci* 2019*, 97*, 4349–4361.
91. Adjei–Fremah, S.; Asiamah, E.; Ekwemalor, K.; Osei, B.; Ismail, H.; Jackai, L.E.; Worku, M. The anti–inflammatory effect of cowpea polyphenol in bovine blood. *J Anim Sci* 2017*, 95*, 27.
92. Capozzi, A.; Saucier, C.; Bisbal, C.; Lambert, K. Grape polyphenols in the treatment of human skeletal muscle damage due to inflammation and oxidative stress during obesity and aging: Early outcomes and promises. *Molecules* 2022*, 27*, 6594.
93. Chedea, V.S.; Macovei, ȘO.; Bocsan, I.C.; Măgureanu, D.C.; Levai, A.M.; Buzoianu, A.D.; Pop, R.M. Grape pomace polyphenols as a source of compounds for management of oxidative stress and inflammation—A possible alternative for non–steroidal anti–inflammatory drugs? *Molecules* 2022*, 27*, 6826.
94. Zhang, H.; Chen, Y.; Li, Y.; Jia, P.; Ji, S.; Chen, Y.; Wang, T. Protective effects of pterostilbene against hepatic damage, redox imbalance, mitochondrial dysfunction, and endoplasmic reticulum stress in weanling piglets. *J Anim Sci* 2020*, 98*, skaa328.
95. de la Cerda-Carrasco, A.; López-Solís, R.; Nuñez-Kalasic, H.; Peña-Neira, Á; Obreque-Slier, E. Phenolic composition and antioxidant capacity of pomaces from four grape varieties (Vitis vinifera L.). *J Sci Food Agric* 2015*, 95*, 1521–1527.
96. De Bellis, P.; Maggiolino, A.; Albano, C.; De Palo, P.; Blando, F. Ensiling grape pomace with and without addition of a Lactiplantibacillus plantarum Strain: Effect on polyphenols and microbiological characteristics, in vitro nutrient apparent digestibility, and gas emission. *Frontiers in Veterinary Science* 2022*, 9*, 808293.
97. Ky, I.; Lorrain, B.; Kolbas, N.; Crozier, A.; Teissedre, P. Wine by–products: Phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different French grape varieties. *Molecules* 2014*, 19*, 482–506.
98. Kammerer, D.; Claus, A.; Carle, R.; Schieber, A. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (Vitis vinifera L.) by HPLC–DAD–MS/MS. *J Agric Food Chem* 2004*, 52*, 4360–4367.
99. Capozzi, A.; Saucier, C.; Bisbal, C.; Lambert, K. Grape polyphenols in the treatment of human skeletal muscle damage due to inflammation and oxidative stress during obesity and aging: Early outcomes and promises. *Molecules* 2022*, 27*, 6594.
100. Urkmez, E.; Biricik, H. Grape seed extract supplementation in heat–stressed preweaning dairy calves: I. Effects on antioxidant status, inflammatory response, hematological and physiological parameters. *Anim Feed Sci Technol* 2022*, 292*, 115421.
101. Acero, N.; Manrique, J.; Muñoz–Mingarro, D.; Martínez Solís, I.; Bosch, F. Vitis vinifera L. leaves as a source of phenolic compounds with anti–inflammatory and antioxidant potential. *Antioxidants* 2025*, 14*, 279.

102. Kohut, L.; Baldovska, S.; Mihal, M.; Belej, L.; Sirotkin, A.V.; Roychoudhury, S.; Kolesarova, A. The multiple actions of grape and its polyphenols on female reproductive processes with an emphasis on cell signalling. *Frontiers in endocrinology* 2024*, 14*, 1245512.
103. Pari, L.; Suresh, A. Effect of grape (Vitis vinifera L.) leaf extract on alcohol induced oxidative stress in rats. *Food and chemical toxicology* 2008*, 46*, 1627–1634.
104. Mohammed, S.A.; Saad, H.M.; Esmail, K.A.; Eliwa, D.; Rohiem, A.H.; Awad, A.A.; El–Adawy, S.A.; Amer, S.S.; Abdelhiee, E.Y. Protection by Vitis vinifera L. Against Cisplatin–Induced Testicular Injury: Oxidative Stress, Inflammation, and Ferroptosis. *Pharmaceuticals* 2026*, 19*, 178.
105. Adam, S.H.; Giribabu, N.; Kassim, N.; Kumar, K.E.; Brahmayya, M.; Arya, A.; Salleh, N. Protective effect of aqueous seed extract of Vitis Vinifera against oxidative stress, inflammation and apoptosis in the pancreas of adult male rats with diabetes mellitus. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2016*, 81*, 439–452.
106. Romero, M.J.; Madrid, J.; Hernandez, F.; Ceron, J.J. Digestibility and voluntary intake of vine leaves (Vitis vinifera L.) by sheep. *Small Ruminant Research* 2000*, 38*, 191–195.
107. Huerta, A.; Trocino, A.; Birolo, M.; Pascual, A.; Bordignon, F.; Radaelli, G.; Bortoletti, M.; Xiccato, G. Growth performance and gut response of broiler chickens fed diets supplemented with grape (Vitis vinifera L.) seed extract. *Italian Journal of Animal Science* 2022*, 21*, 990–999.
108. Chikwanha, O.C.; Muchenje, V.; Nolte, J.E.; Dugan, M.E.; Mapiye, C. Grape pomace (Vitis vinifera L. cv. Pinotage) supplementation in lamb diets: Effects on growth performance, carcass and meat quality. *Meat Sci* 2019*, 147*, 6–12.
109. Hafeez, A.; Ullah, S.; Naz, S.; Alrefaei, A.F.; Khan, R.U.; Abdelrahman, S.H.; Losacco, C.; Selvaggi, M. Effect of dietary polyphenol rich grape (Vitis vinifera) seed extract supplementation on production performance, egg quality, plasma MDA, reproductive performance and faecal microbiota of golden laying hens. *J Appl Anim Res* 2024*, 52*, 2365748.
110. Bradford, B.J.; Yuan, K.; Farney, J.K.; Mamedova, L.K.; Carpenter, A.J. Invited review: Inflammation during the transition to lactation: New adventures with an old flame. *J Dairy Sci* 2015*, 98*, 6631–6650.
111. Plaizier, J.C.; Krause, D.O.; Gozho, G.N.; McBride, B.W. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. *The Veterinary Journal* 2008*, 176*, 21–31.
112. Zebeli, Q.; Metzler–Zebeli, B.U.; Ametaj, B.N. Meta–analysis reveals threshold level of rapidly fermentable dietary concentrate that triggers systemic inflammation in cattle. *J Dairy Sci* 2012*, 95*, 2662–2672.
113. Abuelo, A.; Hernández, J.; Benedito, J.L.; Castillo, C. The importance of the oxidative status of dairy cattle in the periparturient period: revisiting antioxidant supplementation. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2015*, 99*, 1003–1016.
114. Bertoni, G.; Trevisi, E.; Han, X.; Bionaz, M. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *J Dairy Sci* 2008*, 91*, 3300–3310.
115. Bradford, B.J.; Yuan, K.; Farney, J.K.; Mamedova, L.K.; Carpenter, A.J. Invited review: Inflammation during the transition to lactation: New adventures with an old flame. *J Dairy Sci* 2015*, 98*, 6631–6650.
116. Gessner, D.K.; Schlegel, G.; Ringseis, R.; Schwarz, F.J.; Eder, K. Up–regulation of endoplasmic reticulum stress induced genes of the unfolded protein response in the liver of periparturient dairy cows. *BMC veterinary research* 2014*, 10*, 46.

117. Hagita, Y.; Miura, R.; Shirasuna, K.; Ajito, T.; Matsumoto, H. Effects of oxidative stress and antioxidant activity in plasma and uterine fluid during early postpartum on subsequent reproductive performance of Japanese black cows. *Animals* 2025*, 15*, 767.
118. Li, Y.; Shi, C.; Deng, J.; Qiu, X.; Zhang, S.; Wang, H.; Qin, X.; He, Y.; Cao, B.; Su, H. Effects of grape pomace on growth performance, nitrogen metabolism, antioxidants, and microbial diversity in Angus bulls. *Antioxidants* 2024*, 13*, 412.
119. Eder, K.; Gessner, D.K.; Ringseis, R. Fibroblast growth factor 21 in dairy cows: Current knowledge and potential relevance. *Journal of animal science and biotechnology* 2021*, 12*, 97.
120. Gessner, D.K.; Winkler, A.; Koch, C.; Dusel, G.; Liebisch, G.; Ringseis, R.; Eder, K. Analysis of hepatic transcript profile and plasma lipid profile in early lactating dairy cows fed grape seed and grape marc meal extract. *BMC Genomics* 2017*, 18*, 253.
121. Gobert, M.; Martin, B.; Ferlay, A.; Chilliard, Y.; Graulet, B.; Pradel, P.; Bauchart, D.; Durand, D. Plant polyphenols associated with vitamin E can reduce plasma lipoperoxidation in dairy cows given n–3 polyunsaturated fatty acids. *J Dairy Sci* 2009*, 92*, 6095–6104.
122. Chedea, V.S.; Palade, L.M.; Marin, D.E.; Pelmus, R.S.; Habeanu, M.; Rotar, M.C.; Gras, M.A.; Pistol, G.C.; Taranu, I. Intestinal Absorption and Antioxidant Activity of Grape Pomace Polyphenols. *Nutrients* 2018*, 10*, DOI 10.3390/nu10050588..
123. Signor, M.H.; de Freitas dos Santos, A.L.; de Vitt, M.G.; Nora, L.; Lago, R.V.P.; Wolschick, G.J.; Correa, N.G.; Klein, B.; Xavier, A.C.H.; Wagner, R. Grape seed oil in the diet of primiparous Jersey cows before and after parturition: effects on performance, health, rumen environment, and milk quality. *Trop Anim Health Prod* 2024*, 56*, 202.
124. Huang, Y.; Oikonomou, G.; Hu, J.; Li, Y.; Du, X.; Du, Y.; Liu, Y.; Zhang, P.; Wang, P.; Yu, H. Effect of feeding grape seed Proanthocyanidin extract on production performance, metabolic and anti–oxidative status of dairy cattle. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2019*, 71*, 1207–1216.
125. Urkmez, E.; Biricik, H. Grape seed extract supplementation in heat–stressed preweaning dairy calves: I. Effects on antioxidant status, inflammatory response, hematological and physiological parameters. *Anim Feed Sci Technol* 2022*, 292*, 115421.
126. Ma, J.; Fan, X.; Zhang, W.; Zhou, G.; Yin, F.; Zhao, Z.; Gan, S. Grape seed extract as a feed additive improves the growth performance, ruminal fermentation and immunity of weaned beef calves. *Animals* 2023*, 13*, 1876.
127. Iannaccone, M.; Elgendy, R.; Giantin, M.; Martino, C.; Giansante, D.; Ianni, A.; Dacasto, M.; Martino, G. RNA sequencing–based whole–transcriptome analysis of friesian cattle fed with grape pomace–supplemented diet. *Animals* 2018*, 8*, 188.
128. Li, Y.; Shi, C.; Deng, J.; Qiu, X.; Zhang, S.; Wang, H.; Qin, X.; He, Y.; Cao, B.; Su, H. Effects of grape pomace on growth performance, nitrogen metabolism, antioxidants, and microbial diversity in Angus bulls. *Antioxidants* 2024*, 13*, 412.
129. Bo, G.A.; Cutais, L.; Peres, L.C.; Pincinato, D.; Maraña, D.; Baruselli, P.S. Technologies for fixed–time artificial insemination and their influence on reproductive performance of Bos indicus cattle. *Bioscientifica Proceedings* 2019*, 6*, 223–236.
130. Vicentini, R.R.; Montanholi, Y.R.; Veroneze, R.; Oliveira, A.P.; Lima, M.L.P.; Ujita, A.; El Faro, L. Infrared thermography reveals surface body temperature changes during proestrus and estrus reproductive phases in Gyr heifers (Bos taurus indicus). *Journal of Thermal Biology* 2020*, 92*, DOI 10.1016/j.jtherbio.2020.102662..
131. Moorey, S.E.; Read, C.C.; Perry, G.A.; Pohler, K.G.; McLean, M.K.; Ciernia, L.A.; Ketchum, J.N.; Smith, M.F.; Patterson, D.J. Physiology of the estrus cycle.

Proceedings of the Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle, North Platte, NE, USA 2019, 20–21.
132. Van Eerdenburg, F.; Loeffler, H.; Van Vliet, J.H. Detection of oestrus in dairy cows: a new approach to an old problem. *Vet Q* 1996*, 18*, 52–54.
133. Kerbrat, S.; Disenhaus, C. A proposition for an updated behavioural characterisation of the oestrus period in dairy cows. *Appl Anim Behav Sci* 2004*, 87*, 223–238.
134. Maatje, K.; Loeffler, S.H.; Engel, B. Predicting optimal time of insemination in cows that show visual signs of estrus by estimating onset of estrus with pedometers. *J Dairy Sci* 1997*, 80*, 1098–1105.
135. Wangler, A.; Meyer, A.; Rehbock, F.; Sanftleben, P. Wie effizient ist die Aktivitätsmessung als ein Hilfsmittel in der Brunsterkennung bei Milchrindern. *Züchtungskunde* 2005*, 77*, 110–127.
136. Peter, A.T.; Vos, P.; Ambrose, D.J. Postpartum anestrus in dairy cattle. *Theriogenology* 2009*, 71*, 1333–1342.
137. Shipka, M.P. A note on silent ovulation identified by using radiotelemetry for estrous detection. *Appl Anim Behav Sci* 2000*, 66*, 153–159.
138. Gaude, I.; Kempf, A.; Strüve, K.D.; Hoedemaker, M. Comparison of visual and computerized estrous detection and evaluation of influencing factors. *Anim Reprod Sci* 2017*, 184*, 211–217.
139. Cushman, R.A.; Kaps, M.; Snider, A.P.; Crouse, M.S.; Woodbury, B.L.; Keel, B.N.; McCarthy, K.L. Relationship of length of the estrous cycle to antral follicle number in crossbred beef heifers. *Translational Animal Science* 2024*, 8*, txae074.
140. Cooper–Prado, M.J.; Long, N.M.; Wright, E.C.; Goad, C.L.; Wettemann, R.P. Relationship of ruminal temperature with parturition and estrus of beef cows. *J Anim Sci* 2011*, 89*, 1020–1027.
141. Kim, D.; Kwon, W.; Ha, J.; Moon, J.; Yi, J. Increased accuracy of estrus prediction using ruminoreticular biocapsule sensors in Hanwoo (Bos taurus coreanae) cows. *Journal of Animal Science and Technology* 2023*, 65*, 759.
142. Haadem, C.S.; Holmøy, I.H.; Nødtvedt, A.; Martin, A.D. Time of insemination in relation to pregnancy rates in beef cattle after oestrus detection with automated activity monitoring system. *Acta Vet Scand* 2023*, 65*, 20.
143. Hojo, T.; Sakatani, M.; Takenouchi, N. Efficiency of a pedometer device for detecting estrus in standing heat and silent heat in Japanese Black cattle. *Animal Science Journal* 2018*, 89*, 1067–1072.
144. Yoshioka, H.; Ito, M.; Tanimoto, Y. Effectiveness of a real–time radiotelemetric pedometer for estrus detection and insemination in Japanese Black cows. *Journal of Reproduction and Development* 2010*, 56*, 351–355.
145. Richeson, J.T.; Lawrence, T.E.; White, B.J. Using advanced technologies to quantify beef cattle behavior. *Translational Animal Science* 2018*, 2*, 223–229.
146. Robért, B.D.; White, B.J.; Renter, D.G.; Larson, R.L. Determination of lying behavior patterns in healthy beef cattle by use of wireless accelerometers. *Am J Vet Res* 2011*, 72*, 467–473.
147. Fromm, K.; Heinicke, J.; Ammon, C.; Amon, T.; Hoffmann, G. Performance of a UHF RFID Detection System to Assess Activity Levels and Lying Behaviour in Fattening Bulls. *AgriEngineering* 2024*, 6*, 1886–1897.
148. Pezeshki, A.; Stordeur, P.; Wallemacq, H.; Schynts, F.; Stevens, M.; Boutet, P.; Peelman, L.J.; De Spiegeleer, B.; Duchateau, L.; Bureau, F. Variation of inflammatory dynamics and mediators in primiparous cows after intramammary challenge with Escherichia coli. *Vet Res* 2011*, 42*, 1–10.
149. Uskenov, R.; Issabekova, S.; Mukhanbetkaliyeva, A.; Akibekov, O.; Zhagipar, F. Digital technologies in dairy cattle breeding to improve the reproductive function of

cows and heifers: A case study in Northern Kazakhstan. *Veterinary World* 2024*, 17*, 2385.
150. Hockey, C.D.; Morton, J.M.; Norman, S.T.; McGowan, M.R. Evaluation of a neck mounted 2-hourly activity meter system for detecting cows about to ovulate in two paddock-based Australian dairy herds. *Reproduction in Domestic Animals* 2010*, 45*, e107–e117.
151. Neethirajan, S. The role of sensors, big data and machine learning in modern animal farming. *Sensing and bio–sensing research* 2020*, 29*, 100367.
152. Johnston, D.J.; Dayman, M.; Grant, T.P.; Hubbard, K.; Goodwin, K.; Doughty, A.K.; Cook, J.D. Remote sensor collars measure age at puberty in tropical beef heifers in northern Australia. 2023.
153. Cutress, D. The future of technologies for cattle fertility and calf health. 2020.
154. Carneiro, M.W.; Brancato, L.; Wylleman, B.; van Zwol, E.; Conings, L.; Vueghs, P.; Gorbaslieva, I.; Van den Bossche, J.; Rudenko, O.; Janicot, M. Safety evaluation of long–term temperature controlled whole–body thermal treatment in female Aachen minipig. *International Journal of Hyperthermia* 2021*, 38*, 165–175.
155. Piccione, G.; Caola, G.; Refinetti, R. Daily and estrous rhythmicity of body temperature in domestic cattle. *BMC physiology* 2003*, 3*, 1–8.
156. Marquez, H.P.; Ambrose, D.J.; Schaefer, A.L.; Cook, N.J.; Bench, C.J. Evaluation of infrared thermography combined with behavioral biometrics for estrus detection in naturally cycling dairy cows. *Animal* 2021*, 15*, 100205.
157. Skliarov, P.; Fedorenko, S.; Naumenko, S.; Onyshchenko, O.; Bilyi, D.; Mylostyvyi, R.; Vakulyk, V.; Kuraksina, L. Infrared thermography as a method of diagnosing reproductive pathologies in animals. *Multidisciplinary Reviews* 2023*, 6*, 2023007.
158. Burfeind, O.; Von Keyserlingk, M.; Weary, D.M.; Veira, D.M.; Heuwieser, W. Repeatability of measures of rectal temperature in dairy cows. *J Dairy Sci* 2010*, 93*, 624–627.
159. Riaz, U.; Idris, M.; Ahmed, M.; Ali, F.; Farooq, U.; Yang, L. The Potential of Infrared Thermography for Early Pregnancy Diagnosis in Nili–Ravi Buffaloes. *Animals* 2024*, 14*, 1966.
160. Salles, M.S.V.; Da Silva, S.C.; Salles, F.A.; Roma Jr, L.C.; El Faro, L.; Mac Lean, P.A.B.; de Oliveira, C.E.L.; Martello, L.S. Mapping the body surface temperature of cattle by infrared thermography. *J Therm Biol* 2016*, 62*, 63–69.
161. Lunstra, D.D.; Coulter, G.H. Scrotal thermography as a tool for predicting semen quality and natural–mating fertility in young beef bulls. 1993.
162. Radigonda, V.L.; Pereira, G.R.; da Cruz Favaro, P.; Barca Júnior, F.A.; Borges, M.H.F.; Galdioli, V.H.G.; Júnior, C.K. Infrared thermography relationship between the temperature of the vulvar skin, ovarian activity, and pregnancy rates in Braford cows. *Trop Anim Health Prod* 2017*, 49*, 1787–1791.
163. Ozaki, R.; Inoue, S.; Yorozui, Y.; Ichikawa, R.; Yamada, N.; Higashi, S.; Matsuyama, S.; Tsukamura, H.; Ohkura, S.; Uenoyama, Y. Capturing temperature changes on the ocular surface along with estrus and ovulation using infrared thermography in Japanese Black cows. *Journal of Reproduction and Development* 2024*, 70*, 49–54.
164. de Ruediger, F.R.; Yamada, P.H.; Barbosa, L.G.B.; Chacur, M.G.M.; Ferreira, J.C.P.; de Carvalho, N.A.T.; Soriano, G.A.M.; Codognoto, V.M.; Oba, E. Effect of estrous cycle phase on vulvar, orbital area and muzzle surface temperatures as determined using digital infrared thermography in buffalo. *Anim Reprod Sci* 2018*, 197*, 154–161.
165. George, W.D.; Godfrey, R.W.; Ketring, R.C.; Vinson, M.C.; Willard, S.T. Relationship among eye and muzzle temperatures measured using digital infrared thermal imaging and vaginal and rectal temperatures in hair sheep and cattle. *J Anim Sci* 2014*, 92*, 4949–4955.

166. Kang, H.; Park, G.; Na, Y.; Kwon, H.; Lee, S. PSII–16 Thermal sensor–based multiple object tracking system for estrus detection in Korean native beef cattle. *J Anim Sci* 2019*, 97*, 238.
167. Casas–Alvarado, A.; Mota–Rojas, D.; Hernández–Ávalos, I.; Mora–Medina, P.; Olmos–Hernández, A.; Verduzco–Mendoza, A.; Reyes–Sotelo, B.; Martínez–Burnes, J. Advances in infrared thermography: Surgical aspects, vascular changes, and pain monitoring in veterinary medicine. *J Therm Biol* 2020*, 92*, 102664.
168. Tuyttens, F.A.; Molento, C.F.; Benaissa, S. Twelve threats of precision livestock farming (PLF) for animal welfare. *Frontiers in Veterinary Science* 2022*, 9*, 889623.
169. Sharma, B.; Koundal, D. Cattle health monitoring system using wireless sensor network: a survey from innovation perspective. *IET Wireless Sensor Systems* 2018*, 8*, 143–151.
170. Musa, P.; Sugeru, H.; Wibowo, E.P. Wireless sensor networks for precision agriculture: A review of NPK sensor implementations. *Sensors* 2023*, 24*, 51.
171. Official; Journal; of; the; European; Union; L; 276/33 Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes. 2010 Available online: https://eurlex.europa.eu/ homepage.html.
172. Seimas; of; the Republic of Lithuania:; Vilnius, L. The Provisions of the Republic of Lithuania (2012–10–03) for Animal Welfare and Handling. 2012 Available online: https://e–seimas.lrs.lt/portal/legalAct/lt/TAD/TAIS.434660.
173. State Food and Veterinary Service of Lithuania: Vilnius, Lithuania Sub–Statutory Act by the State Food and Veterinary Service of Lithuanian Republic Regarding the Confirmation of the Requirements for Keeping, Maintenance and Use of Animals Intended for Science and Education Purposes; 2012 Available online: https://e–seimas.lrs.lt/portal/legalAct/lt/ TAD/TAIS.437081/asr.
174. AnonymousSerum Biochemical Reference Ranges – Special Subjects. Merck Veterinary Manual. Available online: https://www.merckvetmanual. com/special–subjects/reference–guides/serum–biochemical–reference–ranges.
175. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.A.; Holmes, S.P. DADA2: High–resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods* 2016*, 13*, 581–583.
176. Caporaso, J.G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F.D.; Costello, E.K.; Fierer, N.; Peña, A.G.; Goodrich, J.K.; Gordon, J.I. QIIME allows analysis of high–throughput community sequencing data. *Nature methods* 2010*, 7*, 335–336.
177. Segata, N.; Izard, J.; Waldron, L.; Gevers, D.; Miropolsky, L.; Garrett, W.S.; Huttenhower, C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 2011*, 12*, R60.
178. MyBioSource. Bovine Glutathione Peroxidase 1 (GPX1) ELISA Kit. Cat. No. MBS289398. MyBioSource, Inc., San Diego, CA, USA. Available online: https://www.mybiosource.com/bovine–elisa–kits/glutathione–peroxidase–1–gpx1/459686.
179. Cusabio. Bovine Cu/Zn–Superoxide Dismutase (Cu/Zn–SOD) ELISA Kit. Cat. No. CSB–E14090B. Available online: https://www.cusabio.com/ELISA–Kit/Bovine–CuZn–Superoxide–DismutaseCuZn–SOD–ELISA–Kit–105353.html.
180. MyBioSource. Bovine Malondialdehyde (MDA) ELISA Kit. Cat. No. MBS739193. MyBioSource, Inc., San Diego, CA, USA. Available online: https://www.mybiosource.com/mda–bovine–elisa–kits/malondialdehyde/739193?utm_source.
181. Januškauskas A. Žemės ūkio gyvūnų reprodukcija ir sėklinimas. Metodiniai nurodymai. *„Vetinfo“ leidybinis centras* 2010.
182. Jeon, S.J.; Vieira–Neto, A.; Gobikrushanth, M.; Daetz, R.; Mingoti, R.D.; Parize, A.C.B.; de Freitas, S.L.; da Costa, A.N.L.; Bicalho, R.C.; Lima, S. Uterine microbiota

progression from calving until establishment of metritis in dairy cows. *Appl Environ Microbiol* 2015*, 81*, 6324–6332.
183. Clemmons, B.A.; Reese, S.T.; Dantas, F.G.; Franco, G.A.; Smith, T.P.; Adeyosoye, O.I.; Pohler, K.G.; Myer, P.R. Vaginal and uterine bacterial communities in postpartum lactating cows. *Frontiers in Microbiology* 2017*, 8*, 1047.
184. Pascottini, O.B.; Van Schyndel, S.J.; Spricigo, J.W.; Rousseau, J.; Weese, J.S.; LeBlanc, S.J. Dynamics of uterine microbiota in postpartum dairy cows with clinical or subclinical endometritis. *Scientific reports* 2020*, 10*, 12353.
185. Várhidi, Z.; Csikó, G.; Bajcsy, ÁC.; Jurkovich, V. Uterine disease in dairy cows: A comprehensive review highlighting new research areas. *Veterinary sciences* 2024*, 11*, 66.
186. Pal, M.; Tariku, F.; Rebuma, T.; Seth, D.; Patel, K.B. Growing role of fungi in the reproductive disorders of animals. *J.Adv.Microbiol.Res* 2024*, 5*, 37–42.
187. Sheldon, I.M.; Dobson, H. Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci* 2004*, 82*, 295–306.
188. Chen, H.; Fu, K.; Pang, B.; Wang, J.; Li, H.; Jiang, Z.; Feng, Y.; Tian, W.; Cao, R. Determination of uterine bacterial community in postpartum dairy cows with metritis based on 16S rDNA sequencing. *Veterinary and Animal Science* 2020*, 10*, 100102.
189. Peng, Y.; Wang, Y.; Hang, S.; Zhu, W. Microbial diversity in uterus of healthy and metritic postpartum Holstein dairy cows. *Folia Microbiol (Praha)* 2013*, 58*, 593–600.
190. Li, Y.; Shi, C.; Deng, J.; Qiu, X.; Zhang, S.; Wang, H.; Qin, X.; He, Y.; Cao, B.; Su, H. Effects of grape pomace on growth performance, nitrogen metabolism, antioxidants, and microbial diversity in Angus bulls. *Antioxidants* 2024*, 13*, 412.
191. Ma, J.; Fan, X.; Zhang, W.; Zhou, G.; Yin, F.; Zhao, Z.; Gan, S. Grape seed extract as a feed additive improves the growth performance, ruminal fermentation and immunity of weaned beef calves. *Animals* 2023*, 13*, 1876.
192. Ianni, A.; Di Maio, G.; Pittia, P.; Grotta, L.; Perpetuini, G.; Tofalo, R.; Cichelli, A.; Martino, G. Chemical–nutritional quality and oxidative stability of milk and dairy products obtained from Friesian cows fed with a dietary supplementation of dried grape pomace. *J Sci Food Agric* 2019*, 99*, 3635–3643.
193. Kumar, S.; Mehla, R.K.; Meena, R.K. Pre–and–postpartum managemental intervention through herbal feed supplement (Asparagus racemosus) and its effect on production and reproduction performance during supplementation and post–supplementation period in crossbred cows. *Indian J Anim Sci* 2011*, 81*, 669.
194. Arechiga, C.F.; Ortiz, O.; Hansen, P.J. Effect of prepartum injection of vitamin E and selenium on postpartum reproductive function of dairy cattle. *Theriogenology* 1994*, 41*, 1251–1258.
195. Silper, B.F.; Robles, I.; Madureira, A.; Burnett, T.A.; Reis, M.M.; de Passillé, A.M.; Rushen, J.; Cerri, R. Automated and visual measurements of estrous behavior and their sources of variation in Holstein heifers. I: Walking activity and behavior frequency. *Theriogenology* 2015*, 84*, 312–320.
196. Burnett, T.A.; Kaur, M.; Polsky, L.; Cerri, R.L. Rumen–reticular temperature during estrus and ovulation using automated activity monitors in dairy cows. *Frontiers in Veterinary Science* 2020*, 7*, 597512.
197. Talukder, S.; Thomson, P.C.; Kerrisk, K.L.; Clark, C.; Celi, P. Evaluation of infrared thermography body temperature and collar–mounted accelerometer and acoustic technology for predicting time of ovulation of cows in a pasture–based system. *Theriogenology* 2015*, 83*, 739–748.
198. Saint–Dizier, M.; Chastant–Maillard, S. Potential of connected devices to optimize cattle reproduction. *Theriogenology* 2017*, 112*, 53, DOI 10.1016/j.theriogenology.2017.09.033..

PUBLIKACIJŲ, KURIOSE BUVO PASKELBTI DISERTACIJOS TYRIMŲ REZULTATAI, SĄRAŠAS

Leidiniuose, referuojamuose duomenų bazėje „Clarivate Analytics WEB of Science" ir turinčiuose citavimo rodiklį

1. **Merkelytė, Inga;** Urbšys, Algirdas; Nainienė, Rasa; Rekešiūtė, Audronė; Šiukščius, Artūras. Effects of Grape Extract Supplementation on Postpartum Reproductive Responses in Beef Cows: A Pilot Study // Animals. 2026, t. 16, Nr. 12, straipsnis 1779. ISSN 2076–2615. doi: 10.3390/ani16121779. Prieiga per internetą: https://doi.org/10.3390/ani16121779; https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC13296078/. Citation Index Expanded (Web of Science); Scopus; PubMed; PubMed Central. [S1] [M.kr.: A003] [IF: 2.7, AIF: 2.261, kvartilis: Q1 (2024. InCites JCR SCIE)].
2. **Merkelytė, Inga**; Marašinskienė, Šarūnė; Nainienė, Rasa; Pelenė, Urtė; Šakarnytė, Laura; Šiukščius, Artūras. Bacterial and Fungal Dynamics of the Uterine Microbiota in Postpartum Beef Cows Supplemented with Grape Pomace // Animals. 2026, t. 16, nr. 5, p. 1–21, ISSN 2076–2615. doi:10.3390/ani16050810. Prieiga per internetą: https://doi.org/10.3390/ani16050810; https://www.mdpi.com/2076–2615/16/5/810. Science Citation Index Expanded (Web of Science); Scopus. [S1] [M.kr.: A003] [IF: 2.7, AIF: 2.261, kvartilis: Q1 (2024. InCites JCR SCIE)]

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS NE DISERTACIJOS TEMATIKA

Leidiniuose, referuojamuose duomenų bazėje „Clarivate Analytics WEB of Science" ir turinčiuose citavimo rodiklį

1. **Merkelytė, Inga**; Artūras Šiukščius, and Rasa Nainienė. "The role of sensor technologies in estrus detection in beef cattle: A review of current applications." // Animals. 2025, t. 15, nr. 15, straipsnis 2313, ISSN 2076–2615. doi: 10.3390/ani15152313. Prieiga per internetą: https://doi.org/10.3390/ani15152313. Science Citation Index Expanded (Web of Science); Scopus. [S1] [M.kr.: A003] [IF: 2.7, AIF: 2.261, kvartilis: Q1 (2024. InCites JCR SCIE)]
2. Pelenė, Urtė; Šiukščius, Artūras; Nainienė, Rasa; Merkelytė, Inga; Šveistienė, Rūta.. "The Equine Reproductive Microbiota: Composition, Dynamics, Dysbiosis, and Implications for Fertility in Mares and Stallions." // Animals. 2026, t. 16, nr. 9, straipsnis 1414, ISSN 2076–2615. doi: 10.3390/ani16091414. Prieiga per internetą: https://doi.org/10.3390/ani16091414. Science Citation Index Expanded (Web of Science); Scopus. [S1] [M.kr.: A003].

Kitos publikacijos

1. **Merkelytė, Inga**; Šiukščius, Artūras. Oestrus expression and detection in angus and limousin cattle to improve reproductive performance // Veterinarija ir zootechnika : Livestock production – recent trends and future prospects : Abstracts, 2025, t. 83, nr. Suppl. 3, p. 170 – 170, ISSN 1392–2130, 2669–2511. Prieiga per internetą: <https://hdl.handle.net/20.500.12512/257356>. Scopus. [T1a2] [M.kr.: A003]
2. **Merkelytė, Inga**; Šiukščius, Artūras; Nainienė, Rasa. Research on the expression, detection, and assessment of estrus criteria in limousin and angus cattle breeds to enhance reproductive performance // 19th International Scientific Conference "Students on their way to science" (undergraduate, graduate, post–graduate students) " Collection of Abstracts : April 19th, 2024 / Editorial board: Inese Ozola [et al.], p. 45 – 45, ISSN 2255–9566. Prieiga per internetą: < https://hdl.handle.net/20.500.12512/245778>. [T1e] [M.kr.: A003]
3. **Merkelytė, Inga**; Šiukščius, Artūras. Management of the cattle reproduction process using digitized analysis systems for animal physiological parameters // XIX Baltic Animal Breeding Conference : December 14–15, 2022, Tartu, Estonia : Book of Abstracts / Compiled and

edited by: Haldja Viinalass, David Arney and Alo Tänavots, p. 12 – 12, ISBN 978–9916–669–86–0,978–9916–669–87–7. Prieiga per internetą: <https://hdl.handle.net/20.500.12512/255363>. [T1e] [M.kr.: A003]

DALYVAVIMAS MOKSLINĖSE KONFERENCIJOSE

1. **Merkelytė, Inga**; Šiukščius, Artūras. Management of the cattle reproduction process using digitized analysis systems for animal physiological parameters // XIX Baltic Animal Breeding Conference : December 14–15, 2022, Tartu, Estonia
2. **Merkelytė, Inga**; Šiukščius, Artūras; Nainienė, Rasa. Research on the Expression, Detection, and Assessment of Estrus Criteria in Limousin and Angus Cattle Breeds to Enhance Reproductive Performance // Students on Their Way to Science 19th International Scientific Conference, Jelgava, Latvia, April 19, 2024. Jelgava, Latvia, University of Life Sciences and Technologies.
3. **Merkelytė, Inga;** Šiukščius, Artūras. Estrus Expression and Detection in Angus and Limousin Cattle to Improve Reproductive Performance // 5th International Scientific Conference "Livestock Production: Recent Trends and Future Prospects", Kaunas, Lithuania, October 9–10, 2025.

CURRICULUM VITAE

Name, surname:	**Inga Merkelytė**
Date of birth:	01/12/1996
E–mail:	inga.merkelyte@lsmuni.lt

Education

2021–2026	PhD student at Lithuanian University of Health Sciences, Animal Science Institute.
2015–2021	Master degree of veterinary medicine at Lithuanian University of Health Sciences, Veterinary Acdemy, Mickevičiaus str. 9, 44307 Kaunas, Lithuania.

Work experience:

2021–present	Junior researcher at the Animal Science Institute of Lithuanian University of Health Sciences
2019	Laboratory Assistant, UAB “KG Group”, Jonava, Lithuania.
2018	Veterinary Assistant, UAB “Gyvūnų edenas”, Kaunas, Lithuania.
2017	Veterinary Assistant, UAB “Kaivana”, Kaunas, Lithuania.

Professional experience:

2021– present	Member of the Council of Doctoral Students, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania.
2021– present	Member of the Council of the Institute of Animal Science, Lithuanian University of Health Sciences, Baisogala, Lithuania.

Research projects:

2020–2023	Project Researcher, Project: Enhancing the Performance and Competitiveness of Beef Cattle Farms through Innovative Reproductive Monitoring. Project No.: 35BV-KK-19-1-12072-PR001 Funded by: European Agricultural Fund for Rural Development (EAFRD) and the State Budget of the Republic of Lithuania under the Lithuanian Rural Development Programme 2014–2020.
2025-05 – 2025-07	Project Researcher, Project: Evaluation of the Effectiveness of Ecological Methods for Varroa Control in Honey Bees. Project No.: Bitė-KK-24-1-02496_PR001. Funded by: European Agricultural Guarantee Fund (EAGF) and the State Budget of the Republic of Lithuania under the Lithuanian CAP Strategic Plan 2023–2027, intervention “Research in the Apiculture Sector”.

2025–present	Project Researcher, Project: Application of Novel Technologies, Diagnostics and Genomics to Improve Disease Resistance of Cattle in Grazing Systems. Funding programme: European Partnership on Animal Health and Welfare (EUPAHW). EU Grant Agreement No.: 101136346 (EUPAHW). Funded by: Research Council of Lithuania (LMT), co-funded under the European Union's Horizon Europe programme.

PADĖKA

Dėkoju darbo vadovui dr. Artūrui Šiukščiui už suteiktą galimybę, pagalbą ir patarimus rengiant disertacijos darbą.

Ypatingai dėkoju LSMU Gyvulininkystės instituto direktoriaus pavaduotojai dr. Rasai Nainienei už pasidalintas vertingas žinias, pasitikėjimą, palaikymą bei kritiką.

Nuoširdžiai dėkoju LSMU Gyvulininkystės instituto Gyvūnų veisimo ir reprodukcijos skyriaus kolegai dr. Algirdui Urbšiui už konsultacijas, vertingus patarimus ir pagalbą atliekant statistinę duomenų analizę.

Už bendradarbiavimą atliekant tyrimus noriu padėkoti dr. Modestui Ružauskui, dr. Danieliui Umbrasui bei Aisčiui Domkui.

Taip pat dėkoju LSMU Gyvulininkystės instituto Gyvūnų veisimo ir reprodukcijos skyriaus kolektyvui už draugišką bendradarbiavimą, palaikymą, dalijimąsi profesinėmis žiniomis ir pagalbą atliekant mokslinius tyrimus.

Dėkoju LSMU Mokslo fondo valdybai už suteiktą finansinę paramą atliekant dalį suplanuotų tyrimų.