

**Latvijas Lauksaimniecības universitāte**  
Veterinārmedicīnas fakultāte  
Preklīniskais institūts

*Latvia University of Life Sciences and Technologies*  
*Faculty of Veterinary Medicine*  
*Preclinical institute*



Astra Ārne 

**TOPINAMBŪRA MILTU KONCENTRĀTA UN TĀ SINBIOTIKAS  
IETEKME UZ TEĻU (*BOS TAURUS L.*) AUGŠANU UN  
GREMOŠANAS KANĀLA ATTĪSTĪBU PIRMAJOS  
POSTNATĀLĀS ONTOĢENĒZES MĒNEŠOS**

**JERUSALEM ARTICHOKE FLOUR CONCENTRATION AND ITS  
SYNBIOTIC EFFECT ON CALF (*BOS TAURUS L.*) GROWTH AND  
GASTROINTESTINAL TRACT DEVELOPMENT IN FIRST MONTHS  
OF POSTNATAL ONTOGENESIS**

Promocijas darba KOPSAVILKUMS

Zinātniskā doktora grāda (Ph.D) iegūšanai  
Veterinārmedicīnas zinātnē

**SUMMARY**  
*of the Doctoral thesis for the scientific degree of Ph.D.*

Jelgava 2022

**Promocijas darbs izstrādāts:**

Latvijas Lauksaimniecības universitātes Veterinārmedicīnas fakultātes Preklīniskā institūta Morfofunkcionālajā laboratorijā, Salīdzinošās patoloģijas laboratorijā, LLU Veterinārās klīnikas laboratorijā un Bauskas novada Mežotnes pagasta slaucamo govju ganāmpulkā.

***Research has been carried out at the:***

*Preclinical institute of the Faculty of Veterinary Medicine the Latvia University of Life Sciences and Technologies, Morphofunctional laboratory, In the laboratory of a veterinary clinic of Latvia University of Life Sciences and Technologies, dairy herds of Bauskas region.*

**Promocijas darba zinātniskais vadītāja:*****Scientific supervisor:***

Profesore *Dr. med.vet./professor Dr.med.vet.* **Aija Ilgaža**

**Oficiālie recenzenti:*****Official reviewers:***

- LLU profesors, *Dr.med.vet. /Professor, Dr.med.vet.* **Ilmārs Dūrītis**
- LLU asociētā profesore *Dr.med.vet./Associate professor, Dr.med.vet.* **Dace Keidāne**
- LSMU profesors, *Dr.med.vet./Associate professor, Dr.med.vet* **Aļus Počkevičius**

**Promocijas darba aizstāvēšana** notiks 2022. gada 20. jūnijā pulksten 10.00, LLU

Veterinārmedicīnas fakultātē, Jelgavā K. Helmaņa ielā 8, A300 auditorijā.

*The defense of this theses will take place at Latvia University of Life Sciences and Technologies Faculty of Veterinary Medicine, Jelgava, K. Helmana Street 8, auditorium No A300, on 20th June, 2022 at 1000 o'clock.*

Ar promocijas darbu var iepazīties Latvijas Lauksaimniecības universitātes Fundamentālajā bibliotēkā, Jelgavā, Lielā iela 2 un <http://llufb.llu.lv/lv>

*The thesis is available at the Fundamental Library of the Latvia Univeristy of Life Sciences and Technologies, Lielā street 2, Jelgava and <http://llufb.llu.lv/en>*

# SATURA RĀDĪTĀJS

<b>IEVADS</b> .....	7
Promocijas darba mērķis un hipotēze .....	8
Promocijas darba uzdevumi .....	8
Darbā izvirzītās tēzes .....	8
Darba zinātniskā novitāte .....	9
Personīgais ieguldījums .....	9
<b>PĒTĪJUMA REZULTĀTU APROBĀCIJA</b> .....	10
<b>MATERIĀLI UN METODES</b> .....	11
Pētījuma laiks, objekts, tā raksturojums .....	11
Asins paraugu hematoloģiskā un bioķīmiskā izmeklēšana .....	14
Kuņģu un zarnu postmortālā izmeklēšana .....	14
Audu paraugu histoloģiskā izmeklēšana .....	15
Imūnhistoķīmiskā izmeklēšana .....	16
Datu statistiskā apstrāde .....	17
<b>PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA</b> .....	17
Teļu dzīvmasas izmaiņas un kautsvara iznākums pēc dažādu devu topinambūra miltu koncentrāta un tā sinbiotikas izbarošanas dažādos vecuma posmos .....	17
Dažādu devu topinambūra koncentrāta un sinbiotikas izbarošanas ietekme uz teļu spurekļa un glumenieka morfometriskajiem un masometriskajiem mērījumiem 12 nedēļas veciem teļiem .....	19
Dažādu devu topinambūra koncentrāta un sinbiotikas izbarošanas ietekme uz spurekļa kārpīņu izmēru un muskuļslāņa biezumu 12. nedēļas veciem teļiem .....	21
Dažādu devu topinambūra koncentrāta un tā sinbiotikas izbarošanas ietekme uz dažādu gremošanas kanāla daļu satura pH 12 nedēļas veciem teļiem .....	22
Tukšās zarnas ( <i>jejunum</i> ) mikroskopiskie mērījumi teļiem 12 nedēļu vecumā .....	23

Topinambūra koncentrāta un tā sinbiotikas izbarošanas ietekme uz loka zarnas ( <i>colon</i> ) kriptu dziļumu loka zarnas gļotādā teļiem 12 nedēļu vecumā .....	24
Teļu fekālo masu konsistences izmaiņas dažādos vecuma posmos .....	25
Hematoloģisko rādītāju izmaiņas 4 - 12 nedēļu veciem teļiem pēc dažādu devu topinambūra koncentrāta un tā sinbiotikas izbarošanas ....	27
Asins bioķīmisko rādītāju izmaiņas 4 - 12 nedēļu veciem teļiem pēc dažādu devu topinambūra miltu koncentrāta un tā sinbiotikas izbarošanas .....	34
Topinambūra koncentrāta un tā sinbiotikas izbarošanas ietekme uz loka zarnas ( <i>colon</i> ) imūnoglobulīna A ekspresiju loka zarnas gļotādā teļiem 12 nedēļu vecumā .....	35
Grelīna imūnreaktīvo šūnu skaits un novietojums glumeniekā 12 nedēļu veciem teļiem, kuriem 56 dienas tika izbarots dažādu devu topinambūra miltu koncentrāts un tā kombinācija ar probiotiku .....	36
<b>SECINĀJUMI</b> .....	38
<b>PRIEKŠLIKUMI</b> .....	39
<b>ZINĀTNISKĀS PUBLIKĀCIJAS UN TĒZES</b> .....	40

## TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b> .....	41
Objectives of the doctoral thesis .....	42
Proposed hypothesis .....	42
Scientific novelty of the research .....	43
Personal contribution to promotion work .....	43
<b>APROBATION OF THE RESEARCH RESULTS</b> .....	43
<b>MATERIALS AND METHODS</b> .....	45
Research time, object, its characteristics .....	45
Haematological and biochemical examination of blood samples .....	46
Postmortem examination of the stomach and intestines.....	47
Histological examination of tissue samples .....	48
Immunohistochemical examination .....	49
Statistical data processing .....	50
<b>RESEARCH RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	50
Calf live weight gain and carcass weight after feeding different doses of Jerusalem artichoke flour concentrate and its synbiotics at different ages .....	50
The influence of different doses of Jerusalem artichoke concentrate and synbiotic feeding on morphometric and masometric measuments of calf rumen and abomasum in 12- week-old calves .....	51
The influence of different doses of Jerusalem artichoke concentrate and synbiotic feeding on rumen size and muscle layer thickness in 12-week- old calves .....	53
Influence of feeding of different doses of Jerusalem artichoke concentrate and its synbiotic on the pH of various parts of the digestive tract in 12-week-old calves .....	54
Microscopic measurements of the jejunum of calves at 12 weeks of age .....	55
Influence of the Jerusalem artichoke concentrate and its synbiotic feeding on the depth of the colonic crypt in the mucosa of calves at 12 weeks of age.....	55
The changes of faecal consistence in calves at different ages .....	56

Changes of haematological parameters in 4-12 week old calves after feeding different doses of Jerusalem artichoke concentrate and its synbiotics .....	57
Changes in blood biochemistry in 4-12 week old calves after feeding different doses of Jerusalem artichoke flour concentrate and its synbiotics .....	60
Influence of the feeding of Jerusalem artichoke concentrate and its synbiotic on the expression of immunoglobulinA in the intestinal mucosa of colon of calves at 12 weeks of age .....	61
Number and location of immunoreactive cells containing ghrelin in the abomasum of 12-week-old calves fed 56 days with Jerusalem artichoke flour concentrate and its synbiotic.....	62
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>63</b>
<b>PROPOSALS.....</b>	<b>64</b>

## IEVADS

Līdz 3. - 4. dzīves nedēļai teļa gremošanas kanāls vairāk līdzinās vienkameru kuņģa dzīvnieka nekā daudzkameru kuņģa jeb atgremotājdzīvnieka gremošanas kanālam (Diao, Zhang un Tu, 2017). Vislielākais veselības un dzīvības riska periods teļiem ir no 7. līdz 21. dzīves dienai, jo šajā periodā kolostrālā imunitāte ir kritusies, bet iegūtā imunitāte vēl nav izveidojusies. Šajā laikā dzīvniekam mainās spurekļa un grāmatnieka masas attiecība, spureklis palielinās, bet grāmatnieks proporcionāli pret spurekli samazinās (Chase, Hurley un Reber, 2008). Līdz ar to pieaug rupjās barības sagremošanas iespējas un samazinās nepieciešamība pēc piena. Iespējams, ka dažādu papildbarību - prebiotiku, probiotiku vai sinbiotiku - izbarošana teļiem pārejas periodā uz atgremotājdzīvnieku paātrinātu spurekļa morfoloģisko un funkcionālo attīstību, kas saimniekiem samazinātu izmaksas, kuras rodas, izbarojot pienu vai piena aizvietotāju. Literatūrā ir atrodami daudz pētījumi par vienkameru kuņģa dzīvniekiem, kuriem izbarotas probiotikas, prebiotikas vai citas papildbarības, taču trūkst kompleksu pētījumu par šāda tipa papildbarību līdzekļu izbarošanu un to ietekmi uz teļu augšanu un veselību.

Zināms, ka gremošanas kanālā un visā organismā kopumā atrodas neskaitāmi daudz organismam labvēlīgo baktēriju, kam ir dzīvībai svarīga loma organisma imunitātes nodrošināšanā un gremošanas procesā (Garcia-Mazcorro un Minamoto, 2013). Bieži sastopama patoloģija teļiem pirmajos divos postnatālajos mēnešos ir diareja, kurai kā viens no cēloņiem tiek minēts patogēno mikroorganismu pārmērīga savairošanās gremošanas kanālā. Nousiainen ar līdzautoriem (2004) izpētījuši, ka jaundzīvnieku gremošanas kanāla mikroorganismi reaģē uz dažāda veida stresu, it sevišķi, ja tas ir saistīts ar dzīvnieku barības vai vides maiņu, kas teļiem var izraisīt diareju. Gremošanas kanāla darbības traucējumu profilaksei un slimību ārstēšanā zinātnieki arvien biežāk iesaka lietot papildbarību - prebiotikas vai probiotikas - vienlaicīgi meklējot jaunas to kombinācijas jeb sinbiotikas, kas ir perspektīva alternatīva antibiotiku lietošanai. Tas mazina risku, ka veidosies pret antibiotikām rezistenti baktēriju celmi, kas ir ļoti aktuāla problēma gan veterinārajā, gan cilvēku medicīnā, gan apkārtējā vidē, jo šādi celmi sastopami augsnē un ūdeņos (Fey *et al.*, 2000; Sardar *et al.*, 2021).

Polisaharīds inulīns pieder fruktānu grupai un ir viens no biežāk pētījumos izmantotajām prebiotikām. Tā iegūšanas izmaksas ir zemas, bet iegūtais produkts ir ar augstu bioloģisko vērtību (Samanta *et al.*, 2013). Inulīnu, tā  $\beta$  - (2, 1) saites dēļ, zīdītāju enzīmi nespēj hidrolizēt un gremošanas kanālā to fermentē baktērijas. Izpētīts, ka inulīna tipa fruktāni var ietekmēt zarnu mikrobiotu, metabolismu un normalizēt glikēmiju aptaukošanās gadījumos gan dzīvniekiem, gan cilvēkiem (Neyrinck *et al.*, 2016). Viens no ar inulīnu bagātākajiem augiem ir topinambūrs (*Helianthus tuberosus*), kur inulīna koncentrācija dabīgi sasniedz

15–20%, tāpēc šo augu izmanto šīs vielas rūpnieciskai ieguvei (Fleming un Groot, Wassink, 1979, Wei *et al.*, 2017).

*Enterococcus* ģints baktērijas ir visvairāk izpētītās un piemērotākās probiotikas lopkopībā, jo tās ir sastopamas veselu dzīvnieku gremošanas kanālā. *Enterococcus faecium* ir gram-pozitīvas baktērijas, kas pieder pienskābo baktēriju grupai (LAB), kuras spēj fermentēt laktozi, arabinozi un mannītu (Chaucheyras *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 2016).

### Promocijas darba mērķis un hipotēze

Promocijas darba **mērķis**: noskaidrot topinambūra miltu koncentrāta (satur prebiotiku inulīns) un jaunas sinbiotikas (tā kombinācija ar *Enterococcus faecium*) dažādu devu ietekmi uz dzīvnieku augšanu, vispārējo veselības stāvokli un gremošanas kanāla orgānu attīstību teļiem pirmajos postnatālās ontogēzes mēnešos.

### Promocijas darba uzdevumi

1. Izpētīt dažādu devu topinambūra miltu koncentrāta vai tā sinbiotikas 56 dienas ilgas izbarošanas ietekmi uz dzīvsvāra, gremošanas kanāla daļu masometriskajiem un morfometriskajiem rādītājiem teļiem 12 nedēļu vecumā;
2. Noskaidrot topinambūra miltu koncentrāta (satur prebiotiku inulīns) vai jaunas sinbiotikas (topinambūra miltu koncentrāts kombinācijā ar *E. faecium*) dažādu devu ietekmi uz vispārējās veselības stāvokļa, tai skaitā, fekālo masu konsistenci, asins bioķīmiskajiem un hematoloģiskajiem rādītājiem 4 - 12 nedēļu veciem teļiem;
3. Izvērtēt kuņģa, tievās un resnās zarnas morfofunkcionālo rādītāju un mikroskopiskās izmaiņas pēc 56 dienu ilgas dažādu devu topinambūra miltu koncentrāta vai tā sinbiotikas izbarošanas 12 nedēļu veciem teļiem;
4. Izvērtēt dažādu devu topinambūra miltu koncentrāta vai jaunizveidotās sinbiotikas 56 dienu ilgas izbarošanas ietekmi uz imūnglobulīna A ekspresiju 12 nedēļu vecu teļu loka zarnas (*colon*) vidusdaļas audos;
5. Izvērtēt greļina imūnreaktīvo šūnu daudzumu glūmeniekā 12 nedēļu veciem teļiem pēc 56 dienu ilgas dažādu devu prebiotiku un sinbiotiku izbarošanas.

### Darbā izvirzītās tēzes

1. Topinambūra miltu koncentrāta un tā sinbiotikas izbarošana veicinās teļu augšanu un uzlabos gremošanas kanāla masometrisko un morfometrisko attīstību, uzlabojot teļu vispārējo veselības stāvokli pārejas periodā par atgremotāju;



2. Topinambūra miltu koncentrāta un tā sinbiotikas izbarošana veicinās teļu spurekļa, glumenieka, tievās un resnās zarnas mikroskopisko attīstību, tādejādi uzlabojot barības sagremošanu un uzsūkšanos;
3. Topinambūra miltu koncentrātam, pievienojot probiotiku *Enterococcus faecium*, teļu dzīvmasa būs lielāka, uzlabosies vispārējās veselības stāvoklis, spurekļa kārpīņas un tievo zarnu bārkstiņas būs garākās un platākas, salīdzinot ar tādu pašu devu topinambūra miltu koncentrātu saņēmušo teļu grupām;
4. Lielākas devas topinambūra miltu koncentrāta vai tā sinbiotikas izbarošana dzīvniekiem sniegs labāku efektu uz teļu dzīvmasas, gremošanas kanāla masometriskajiem, makromorfometriskajiem mērījumiem, vispārējās veselības rādītājiem, mikromorfometriskajiem parametriem.

### **Darba zinātniskā novitāte**

Pirmo reizi izvērtēta Latvijā ražotā topinambūra miltu koncentrāta (satur 48.5 - 50.1% prebiotiku inulīns) un tā kombinācijas sinbiotikā ar probiotiku *E. faecium* ( $2 \times 10^9$  KVV/g) dažādu devu ietekme uz teļu augšanu un vispārējo veselības stāvokli, kā arī greļina IR šūnu sastopamība glumenieka gļotādā un imūnglobulīna A ekspresiju *colon* gļotādā teļiem pārejas periodā uz atgremotājiem. Iegūti jauni dati par dažādu devu topinambūra miltu koncentrāta (inulīns 3 g, 6 g, 12 g diennaktī dzīvniekam) un sinbiotikas (3 g, 6 g, 12 g inulīns ar 0.25 g *E. faecium* diennaktī dzīvniekam) 56 dienas ilgās izbarošanas ietekmi uz gremošanas kanāla masometrisko, makro- un mikromorfometrisko attīstību 12 nedēļu veciem teļiem.

### **Personīgais ieguldījums**

Esmu veikusi visu pētījumā iesaistīto teļu klīnisko apskati un izmeklēšanu, veikusi dzīvmasas mērījumus, ieguvusi asins paraugus, veikusi visu asins paraugu hematoloģisko izmeklēšanu, histoloģisko audu paraugu iegūšanu fiksēšanu, krāsošanu, veikusi masometriskos un morfometriskos mērījumus, veikusi visu preparātu vizuālo izvērtēšanu, uzskaiti, datu statistisko apstrādi un analīzi, esmu arī visu mikrofotogrāfiju autore.

## PĒTĪJUMA REZULTĀTU APROBĀCIJA

Pētījuma rezultāti prezentēti 9 konferencēs:

1. **Astra Ārne**, Aija Ilgaža. "Teļiem piemērotu probiotisko līdzekļu pieejamība Latvijā. The probiotic resource availability of calves in Latvia". Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna: konferences "Veterinārmedicīnas zinātnes un prakses aktualitātes" raksti, Jelgava, 2012. gada 22.-23. novembrī, Latvijas Lauksaimniecības universitāte. Veterinārmedicīnas fakultāte. (Stenda referāts)
2. **Astra Ārne**, Aija Ilgaža. "Jerusalem artichoke flour feeding effects on calf development in the first months of life". Research for Rural Development, 2014: annual 20th international scientific conference proceedings, Jelgava, 21-23 May 2014. (Mutiska prezentācija)
3. **A. Arne**, A. Ilgaza. "Probiotic and prebiotic effects on calf development in the first months of life". Book of abstracts of the 65th annual meeting of the European Federation for Animal Science, Copenhagen, Denmark, 25-29 August 2014 (Stenda referāts)
4. **Astra Ārne**, Aija Ilgaža. "Prebiotiku un probiotiku ietekme uz teļu augšanu un gremošanas kanāla attīstību pirmajos četros postnatālās ontogēzes mēnešos". Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna: konferences "Veterinārmedicīnas zinātnes un prakses aktualitātes - 2014" raksti, Jelgava, 2014. g. 27.-28. novembrī, Latvijas Lauksaimniecības universitāte. (Stenda referāts)
5. Aija Ilgaza, **Astra Ārne**, Laura Otzule. "Possibilities to reduce the greenhouse gas calculated emissions by speeding up the calf and kid development". Nordic view to sustainable rural development: proceedings of the 25th NJF Congress, Riga, Latvia, 16th-18th of June, 2015. (Stenda referāts)
6. **Astra Arne**, Aija Ilgaza. "Different synbiotic dose feeding effect on the calf digestive channel health, weight gain and intestinal microflora", VII International scientific agriculture symposium "AgroSym 2016" University of East Sarajevo, Faculty of Agriculture, 2016. (Stenda referāts)
7. **Astra Ārne**, Aija Ilgaža. "Different dose inulin feeding effect on calf digestion canal state and development", Research for Rural Development 2016. (Mutiska prezentācija)
8. A. Ilgaza, **A. Arne**. "Different synbiotic dose feeding effect on the calf digestive channel health and weight gain", 16th International conference on Production Diseases in Farm Animals, Wageningen, the Netherlands, 20-23 June 2016. (Stenda referāts)
9. **Astra Ārne**. "Different doses of inulin feeding influences calf growth and general health state". 5th International conference for young researchers Multidirectional research in agriculture, forestry and technology, Kraków, Poland, 16-17 April, 2016. (Stenda referāts)

**Darbs strukturēts piecās nodaļās** - ievads, literatūras apraksts, materiāls un metodes, pētījumā rezultāti un diskusija.

Literatūras aprakstā ietverti 349 literatūras avoti. Darba beigās doti 9 secinājumi. Promocijas darbs noformēts 118 lappusēs, 11 tabulās, 35 attēlos un 5 pielikumos.

## MATERIĀLI UN METODES

### Pētījuma laiks, objekts, tā raksturojums

Pētījums tika veikts laikā no 2012. gada līdz 2016. gadam Mežotnes pagastā, Bauskas novadā slaucamo govju ganāmpulkā. Saimniecībā audzēto teļu barošanas pamatprincipi un turēšanas apstākļi atbilda Pētījumam nepieciešamos datus ieguvām, iekļaujoties saimniecībā esošajā teļu turēšanas, barošanas un veterinārās aprūpes plānā atbilstoši labas veterinārās prakses un ētikas prasībām.

Teļu dzīvmasas noteikšana un asins paraugu iegūšana tika veikta fermā, teļu orgānu morfometriskā novērtēšana tika veikta sertificētā kautuvē "Aibi", hematoloģiskā izmeklēšana un histoloģisko paraugu sagatavošana tika veikta LLU VMF Morfofunkcionālajā laboratorijā, Salīdzinošās patoloģijas laboratorijā un LLU Veterinārās klīnikas laboratorijā.

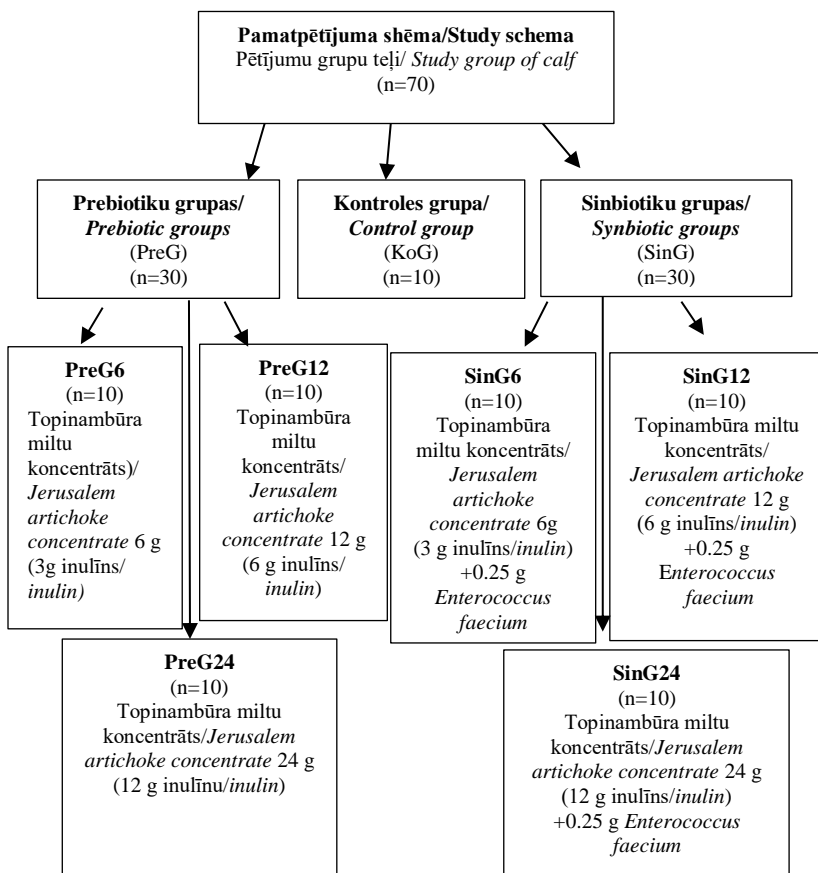
Līdz pētījuma uzsākšanai, kad teļi bija sasnieguši 3 nedēļu vecumu, tiem tika nodrošināti vienādi turēšanas apstākļi. Visi teļi, pēc piedzimšanas 30 minūšu laikā bija saņēmuši divus litrus mātes pirmpienu. Dzīvnieki tika izvēlēti pēc nejauša izvēles atlases principa. Visi teļi, uzsākot pētījumu, tika klīniski novērtēti: noteikta sirdsdarbības frekvence, elpošanas frekvence, mērīta rektālā temperatūra, novērtēts *habitus*. Katrā grupā iekļāvām vīrišķās kārtas, Holšteinas tipa teļus, kuri bija 23 ±5 dienas veci. Pētījumā tika iekļauti tikai klīniski veseli teļi, kuru svars, uzsākot pētījumu, bija 50kg ± 5 kg. Kopā pamatpētījumā, kurš ilga 56 dienas, tika iekļauti 70 vīrišķā dzimuma teļi. Teļi tika turēti pa pieci vienā 7,5 m<sup>2</sup> lielā aizgaldā. Aizgaldi tika tīrīti manuāli vienu reizi dienā. Kūtī tika nodrošināta dabiskā ventilācija. Traukus, no kuriem dzīvnieki tika baroti, mazgāja pēc katras ēdienreizes un dezinficēja pēc nepieciešamības ar dezinfekcijas līdzekli "Ecocid S".

Uzsākot pētījumu un visu pētījuma laiku visiem teļiem, katru dienu divas reizes dienā, tika izbarotīti četri litri pilnpiena, kopā diennaktī izbarojot astoņus litrus. Piens tika aprēķināts katrai teļu grupai un ieliets kopējā silē. Teļiem no pirmās pētījuma dienas siens un ūdens bija pieejams *ad libitum*, no 14. pētījuma dienas, teļiem sasniedzot piecu-sešu nedēļu vecumu, diētai pievienojām spēkbarību. Sākumā spēkbarības deva bija 100 g/dnn uz dzīvnieku, ko pakāpeniski palielinājām un pētījuma beigās katram teļam spēkbarības deva bija 500 g/dnn. Spēkbarība tika ražota saimniecībā uz vietas, tās sastāva pamatā bija kviešu graudi, un tā nesaturēja augšanas stimulatorus vai antibiotikas.

Tika izveidotas 7 dažādas pētījuma grupas, kuras atšķīrās ar izbarotajām barības piedevām un to devām (1. att.). Kontroles grupas dzīvnieki saņēma tikai ikdienā paredzēto barības devu, bez barības piedevām. Teļi katrā pētījuma grupā kopā ar pilnpienu saņēma atšķirīgu barības piedevas veidu un devu. Trijām teļu grupām, kuras apzīmējām kā prebiotiku grupas (PreG6; PreG12; PreG24), papildus izbarojām prebiotiku saturošu topinambūra miltu koncentrātu (inulīns  $50 \pm 2\%$ ) 6 g, 12 g vai 24 g. Atlikušās trīs grupas nosaucām par sinbiotiku grupām, jo šiem teļiem pie izēdināmā piena pievienojām jaunizveidotu sinbiotiku (SinG6; SinG12; SinG24): 0.25 g *E. faecium* ( $2 \times 10^9$  CFU/g) kombinācijā ar inulīnu saturošu topinambūra miltu devu: 6 g, 12 g vai 24 g.

Pētījuma laikā sekojām dzīvnieku vispārējam veselības stāvoklim un dzīvmasas pieaugumam. Fermas darbinieks katru dienu novērtēja teļu apetīti un fekālo masu konsistenci, ko atzīmēja speciāli izveidotā tabulā. Fekāliju konsistences novērtējumam piemērojām Larsona izveidoto baļļu skalu, kur 0 - cietas, nav diarejas pazīmes 1 - mīkstas, 2 - šķidrās, fekāliju konsistence zudusi un 3 - ūdeņainas fekālijas (Larson *et al.*, 1977).

Vienu reizi divās nedēļās dzīvniekiem noteicām ķermeņa masu, nomērot krūšu apkārtmēru, ar speciālu mērlenti ("*we-Bo tape*"), veicot mērījumu aiz lāpstiņām (Dingwell *et al.*, 2006). Pirmo reizi, uzsākot pētījumu (0. dienā) jeb četru nedēļu vecumā, tad 14. pētījuma dienā (sešu nedēļu vecumā), 28. pētījuma dienā (astoņu nedēļu vecumā), 42. pētījuma dienā (10 nedēļu vecumā) un pētījuma noslēgumā 12 nedēļu vecumā jeb 56. pētījuma dienā.



1. att. **Pētījuma shēma/**  
*Fig. 1 Study schema*

Pēc ķermeņa masas noteikšanas, tika veikta asins paraugu iegūšana, asins hematoloģiskai un bioķīmiskai izmeklēšanai, kā arī tika veikta vispārējā veselības pārbaude: izmērīta rektālā temperatūra, izklausi sirdsdarbība, skaitīta elpošanas frekvence un novērtēta gļotādu krāsa.

Jāatzīmē, ka pētījuma laikā dzīvniekiem netika veiktas profilaktiskas vakcinācijas vai antibiotiku terapija.

## Asins paraugu hematoloģiskā un bioķīmiskā izmeklēšana

Asins paraugi tika iegūti no ārējās jūgvēnas *v. jugularis externa*, uzsākot pētījumu 0., 14. un 28. pētījuma dienā, katru reizi no rīta 7:00 pirms dzīvnieku barošanas. Noslēdzot pētījumu jeb 56. dienā asins paraugus hematoloģiskai un bioķīmiskai izmeklēšanai ieguvām pirms dzīvnieku rīta barošanas un transportēšanas uz kautuvi. Paraugi tikai iegūti izmantojot 20G adatu, piepildot 3 ml EDTA vakumstobriņus un 6 ml “Vakutest” vakumstobriņus ar recēšanas aktivatoru.

Iegūtie asins paraugi tika ievietoti aukstuma somā un nogādāti laboratorijā izmeklēšanai 4 h laikā pēc parauga iegūšanas. Hematoloģisko analīžu veikšanai tika izmantots hematoloģiskais analizators “BC-2800Vet”, kas atradās Latvijas Lauksaimniecības universitātes Veterinārmedicīnas fakultātes Preklīniskajā institūta Morfofunkcionālajā laboratorijā.

Noteicām hematokrīta (HCT %), hemoglobīna (HGB g/dl), eritrocītu (RBC  $\times 10^{12}/L$ ), leikocītu (WBC  $\times 10^9/L$ ), limfocītu (LYMF  $\times 10^9/L$ ), monocītu (MONO  $\times 10^9/L$ ) un trombocītu (PLT  $\times 10^9/L$ ) daudzumu. Laboratorijā tika atdalīts asins serums, kas tika iepildīts 2 ml ependorfa stobriņos un ievietots saldētavā  $-23^{\circ}C$ . Bioķīmiskos asins paraugus izmeklēja pēc divām nedēļām Latvijas Lauksaimniecības universitātes Veterinārās klīnikas laboratorijā. Tika noteikti šādi bioķīmiskie rādītāji: gammaglutamiltransferāze (GGT U/L), sārmainā fosfatāze (ALP U/L), kopējais proteīns (TP g/L) un albumīni (ALB g/L). Glikozes līmeni teļu asins paraugos noteicām 0., 14., 28., un 56. jeb noslēdzošajā pētījuma dienā, tūlīt pēc asins parauga iegūšanas no ārējās jugulārās vēnas (*v. jugularis externa*), izmantojot portatīvo glikometru „Optium Freestyle” ar sauso stripu metodi.

## Kuņģu un zarnu postmortālā izmeklēšana

Pētījuma noslēgumā, pēc 56 dienām, katras grupas teļiem tika veikta plānveida kaušana. Pusstundas laikā, pēc dzīvnieka plānveida kaušanas, dažādās gremošanas kanāla vietās veicām nelielus iegriezumus un, izmantojot digitālo pH-metru “pH 3310 SET” laikā veicām intralumenālā pH vērtību noteikšanu: spureklī *atrium ruminis*; glumeniekā pie atveres 12 pirkstu zarnā; tukšās zarnas vidusdaļā; resnās zarnas spirāliskās cilpas vidusdaļā. Pēc tam veicām dzīvnieka gremošanas kanāla makroskopisko novērtēšanu, izmērot un sverot atsevišķus orgānus. Vicām masometriju (kg), nosakot masu gremošanas kanālam ar barības masām, spurekļa (*rumen*) masu ar/bez barības masām, glumenieka (*abomasum*) masu ar/bez barības masām. Gremošanas orgānu masas tika noteiktas izmantojot kautuvē esošos verificētus elektroniskos platformas svarus CASO B5-LED (precizitāte  $\pm 0.100$  g). Aprēķinājām relatīvo kuņģa masu (%) pret teļu ķermeņu masu. Pēc nokaušanas, 30 minūšu laikā, tika noteikta liemeņa masa, izmantojot lielizmēra verificētus DINUS AR GEO WP S/N 01186

(precizitāte  $\pm 0.200$  g) kautuves svarus. Kautķermeni svēra bez ādas un galvas, kura tika atdalīta pie atlanta un pakauša kaula locītavas, bez kāju pēdām, kas tika atdalītas pie karpometakarpālajām un tarsometatarsālajām locītavām, kā arī bez krūšu un vēdera dobuma orgāniem, nierēm, nieru taukiem, iegurņa taukiem, dzimumorgāniem un tiem saistītajiem muskuļiem.

Makroskopisko gremošanas kanāla daļu izmeklēšanu noslēdzām ar spurekli un glumenieku morfometriskiem mērījumiem (cm). Lai to veiktu, spurekli atvērām, veicot garengriezumu pa spurekļa kreiso garenrievu (*sulcus longitudinalis sinister*). Glumenieku atvērām, veicot griezienu pa kuņģa lielo loku (*curvatura ventriculi major*). Garuma un platuma mērījumiem tika izmantots lineāls un lentmērs. Noteicām spurekļa (*rumen*) un glumenieka (*abomasum*) platumu un garumu. Audu paraugi histoloģiskai izpētei tika iegūti no dažādām gremošanas kanāla daļām: spurekļa dorsāla maisa (*saccus dorsalis*), spurekļa ventrālā maisa (*saccus ventralis*), glumenieka (*abomasum*):*pars fundica*, *pars pylorica*, tukšās (*jejunum*) zarnas vidusdaļas, resnās (*colon*) zarnas vidusdaļas.

Audu paraugi (0.5 - 0.7 cm) pēc iegūšanas tika noskaloti ar 0.9% NaCl fizioloģisko šķīdumu un fiksēti 100 ml ar 10% formalīna šķīdumu piepildītos, trauciņos un nomarķēti. Paraugi tika nofiksēti vismaz 48 h, tad uzsākta audu histoloģisko preparātu sagatavošana.

### Audu paraugu histoloģiskā izmeklēšana

Audu histoloģisko paraugu pirmskrāsošanas apstrāde un krāsošana tika veikta VMF Preklīniskā institūta Salīdzinošās patoloģijas laboratorijā. Paraugu dehidratācijai un sagatavošanai, ieslēgšanai parafīna blokos izmantojām audu procesoru *Tissue-Tek II* pēc standarta metodes (Carson, 1997). Pēc paraugu ieslēgšanas parafīna blokos preparāti tika griezti 5  $\mu$ m plānos griezumos un uznesti uz priekšmetstikliņa. Priekšmetstikliņš ar griezumu tika ievietots uz 24 h termostatā 38°C žāvēšanai un nostiprināšanai uz priekšmetstikliņa.

Audu paraugu histoloģiskai krāsošanai izmantojām hematoksilīna un eozīna (H&E) standarta krāsošanas metodi (Carson, 1997). Uz priekšmetstikliņiem termostatā izžāvētie audu griezumiem tika veikta deparafinizācija ksilolā, parauga hidratācijai izmantojām spirta koncentrācijas samazināšanās rindu ar dažādas koncentrācijas spirtiem (100%, 96%, 70%, un 50% koncentrācijās).

Pēc tam tika veikta audu krāsošana ar hematoksolīnu 10 min. un noskalošana ar krāna ūdeni, tad krāsošana ar eozīnu trīs līdz piecas minūtes. Uz audu griezuma uzklāja "*Histofluid mounting medium*" līmes pilienu un pielīmēja segstikliņu.

Iegūtie histoloģiskie paraugi tika izmeklēti gaismas mikroskopā Leica DM 5000B izmantojot datorizētu programmu Image Pro Plus 6.1.

Spurekļa histoloģiskos paraugos mērījām ( $\mu$ m), kārpiņu garumu, platumu un muskuļslāņa biezumu. Bārkstiņas garuma mērījumi veikti no kārpiņas epitēlija

apikālā gala līdz gļotādas muskuļu plātnītei, kārpiņas platuma mērījumi veikti perpendikulāri garuma mērījumiem kārpiņas vidusdaļā. Katrā paraugā izmērīti 5 dažādi redzes lauki ar tur esošajām kārpiņām.

Tievajā zarnā *jejunum* bārkstiņu garumu ( $\mu\text{m}$ ) mērījām no bārkstiņas epitēlija apikālā gala līdz gļotādas muskuļu plātnītei (*lamina muscularis mucosa*), bārkstiņu platums jeb zarnu bārkstiņas garengriezuma diametrs ( $\mu\text{m}$ ) bārkstiņu vidusdaļā līdz epitēliju šūnu apikālajiem galiem perpendikulāri bārkstiņu garumam. Mērījumi tika veikti katrā paraugā 5 redzeslaukos.

Resnajā zarnā *colon* tika mērīts kriptu dziļums ( $\mu\text{m}$ ) no kriptu epitēliju apikālā gala jeb kriptas gala līdz gļotādas muskuļu plātnītei (*lamina muscularis mucosa*), izmeklējot 5 dažādus redzes laukus.

### Imūnhistoķīmiskā izmeklēšana

Imūnreaktīvo (IR) šūnu noteikšanai tika izmantotas audu imūnhistoķīmiskās krāsošanas metodes, lai glumenieka audu griezumos noteiktu greļina, bet resnās zarnas *colon* audu griezumos IgA ekspresiju. Imūnreaktīvo šūnu iezīmēšana veikta ar streptevidīna - biotīna kompleksu (Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse). Audu paraugi tika uznesti uz priekšmetstikliņiem ar silāna pārklājumu (HistoBond®+, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Vācija), 12 h žāvēti termostatā 37°C temperatūrā. Audu paraugiem veikta deparafinizācija ksilolā un hidratācija ar etanola koncentrācijas samazināšanas rindu, līdz paraugi tika ievietoti 65°C buferšķīdumā pH 9.0 (Target Retrieval solution, pH 9, Dako) un apstrādāti, divas reizes ar pārtraukumu, līdz 70°C ar mikroviļņiem 450W 5 min epitopu atbrīvošanai, lai antigēnu piesaistītu antivielai. Pēc karsēšanas paraugi tika atdzesēti līdz istabas temperatūrai un endogēnās peroksidāzes bloķēšanai aplicēti 5 min ar endogēnās peroksidāzes bloķēšanas reaģentu (*Dako Endogenous enzyme block*). IgA identifikācijai kā primārās antivielas tika izmantotas poliklonālas koncentrētas trušu antivielas (*Polyclonal Rabbit Anti-Human IgA*) atšķaidījumā 1:400, bet greļina identifikācijai žurku, peļu poliklonālas antivielas (*Phoenix Pharma. Inc.H- 031-31*) atšķaidījumā 1:500. Audu paraugu inkubācija veikta istabas temperatūrā IgA 1h, bet greļinam mitrā kamerā 3h un pēc tam tika skaloti ar fosfāta buferšķīdumu (*Wash Buffer*, pH 7.4, Dako 2×5 min.).

Lai konstatētu imūnreaktīvo šūnu un primārās antivielas sasaisti, antigēna un antivielas komplekss tika iezīmēts, aplicējot 30 min sekundāro antivielu, kas atbilst primārās antivielas izcelsmei un iekrāsots aplicējot 5 min DAB+ kompleksu (Dako REAL™ EnVision™ Detection System). Kontrastam un, lai izvairītos no artefaktiem audi tika iekrāsoti ar hematoksilīnu.

Katrai preparātu sērijai tika pagatavota pozitīvā kontrole: greļina antivielai izmantoti suņu kuņģa piloriskās daļas histoloģiskie griezumi; IgA antivielu identifikācijai tika izmantots cilvēka ādas paraugs atbilstoši ražotājfirmas



norādītajam protokolam, kur vienmēr tiek novērota pozitīva reakcija. Savukārt kā negatīvā kontrole tika lietoti preparātu paralēlie griezumī, kuros primāra antivielā tika aizstāta ar antivielu atšķaidītāju. Šajos paraugos netika konstatētas imūnreakcijas pret grelīnu vai IgA.

Vērtējot imūnglobulīna (IgA) daudzumu, izmantojām RGB krāsu vērtēšanas modeli, kas paredz parauga izmeklēšanu sarkanajās, zaļās un zilās krāsas spektra kanālā. Izmeklētajā paraugā konstatēto katras krāsas (*red*- sarkana, *green*- zaļa, *blue*- zila) punktu daudzums, nosakot attiecīgās krāsas intensitāti, kas var mainīties robežās no 0 līdz 255. Līdzīgas krāsas objekti absorbē līdzīgas krāsas viļņus, tāpēc, lai pilnvērtīgi vērtētu sarkani brūno krāsu, kādā nokrāsosjās IgA granulas, bija jāizmanto spektra pretējā krāsa jeb zilā (Vrekoussis *et al.*, 2009).

Paraugi tika izmeklēti 400x palielinājumā gaismas mikroskopā (Leica DM 500B) un apstrādāti, izmantojot datorizētu programmu Image Pro Plus 6.1.

### **Datu statistiskā apstrāde**

Datu statistiskā analīze tika veikta ar SPSS statistisko programmatūru un Microsoft Excel datu apstrādes funkcijas. aprēķinot vidējo aritmētisko vērtību (AVERAGE), vidējās vērtības standartklūdu (SD). Iegūto rezultātu atšķirības novērtēšanai, izmantojām Stjudenta T-testu divu izlašu vidējo vērtību salīdzināšanai un triju vai vairāk izlašu salīdzināšanai - vienfaktora dispersiju analīzi (ANOVA). Tika aprēķināti vidējie aritmētiskie radītāji un standartklūda katrā teļu grupā.

Kuņģu absolūto masu, aprēķinot pret ķermeņa masu, ieguvām relatīvo kuņģu masu. Izmantojām T-testu savstarpēji atkarīgu paraugkopu vidējo vērtību salīdzināšanai. Lai salīdzinātu un novērtētu asins rādītāju izmaiņas starp teļu eksperimentālajām grupām, izmantojām F-testu divu paraugkopu dispersiju salīdzināšanai un T-testu divu paraugkopu vidējo salīdzināšanai ar vienādām vai atšķirīgām dispersijām (Arhipova un Bāliņa, 2003). Ja statistikas testu rezultātos iegūtā p vērtība bija mazāka par 0.05, tika noraidīta nulles hipotēze, un testa rezultāts tika atzīts par statistiski nozīmīgu. Iegūto datu normāls sadalījums tika izvērtēts ar Šapiro-Vilka testu (histogramma un Q-Q diagramma). Dispersiju viendabīgumu novērtējām ar Levene testu. Darbā tika veikta korelācijas analīze.

## **PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA**

### **Teļu dzīvmasas izmaiņas un kautsvara iznākums pēc dažādu devu topinambūra miltu koncentrāta un tā sinbiotikas izbarošanas dažādos vecuma posmos**

Mūsu pētījuma rezultāti parāda, ka, salīdzinot ar kontroles grupas teļiem, lielākais un straujākais ķermeņa masa pieaugums ir teļiem, kuriem pie piena

izbaroja dažādās topinambūra miltu koncentrāta un tā sinbiotikas devas. Jau uzsākot pētījumu - pirmajās divās nedēļās ķermeņa masas pieaugums ir būtiski lielāks dzīvniekiem, kuriem papildus izbaroja topinambūra miltu koncentrātu vai tā sinbiotiku. Šī tendence saglabājās visu pētījuma laiku. Par stabili lielāku dzīvsmas pieaugumu liecina arī augstāks vidējais diennakts dzīvsmas pieaugums visu pētījuma laiku topinambūra miltu koncentrāta vai tā sinbiotikas grupām, salīdzinot ar kontroles grupu teļiem (1. tabula).

1. tabula/ Table 1

**Teļu dzīvsmas ( $\bar{x}\pm SD$ ) un diennakts dzīvsmas ( $\bar{x}\pm SD$ ) pieauguma dinamika pētījuma laikā atkarībā no izbarotās barības piedevas/  
Calf total live weight ( $\bar{x} \pm SD$ ) growth and daily live weight ( $\bar{x} \pm SD$ ) gain dynamics during the study depending on the feed additive used**

Grupā/ Group (n=70)	Dzīvsmas pieaugums ( $\bar{x}\pm SD$ ; kg), pētījuma dienās/ Live weight gains ( $\bar{x}\pm SD$ ;kg) at the time period (day)			Diennakts dzīvsmas pieaugums ( $\bar{x}\pm SD$ ; kg), pētījuma dienās/ Daily live weight gains ( $\bar{x}\pm SD$ ;kg) at the time period (day)			Dzīvsvars/ Live weight ( $\bar{x}\pm SD$ ;kg)
	0.-28.	28.-56.	0.-56.	0.-28.	28.-56.	0.-56.	
KoG	18.2± 5.06	12.4± 5.09	31.2± 8.44	0.67± 0.20	0.44± 0.18	0.56± 0.15	82.27± 8.77
PreG6	26.5± 1.90**	18.2± 3.58**	44.7± 4.03**	0.95± 0.07**	0.65± 0.13**	0.80± 0.07**	94.6± 3.69
PreG12	29.0± 1.88**	23.3± 5.09**	52.3± 3.68**	1.03± 0.06**	0.83± 0.17**	0.93± 0.07**	102.3± 3.86
PreG24	25.2± 7.36*	22.9± 5.09**	48.1± 4.18**	0.90± 0.26**	0.82± 0.18**	0.86± 0.08**	101.0± 4.55
SinG6	24.4± 3.68**	24.7± 4.69**	49.1± 2.81**	0.86± 0.19**	0.88± 0.16**	0.88± 0.03**	100.1± 3.14
SinG12	25.7± 1.57**	25.6± 2.32**	51.3± 2.71**	0.91± 0.12**	0.92± 0.08**	0.92± 0.02**	103.0± 2.26
SinG24	22.5± 1.65**	26.1± 3.70**	47.6± 4.28**	0.93± 0.13**	0.93± 0.13**	0.85 ±0.03**	100.0± 3.86

\* p<0.05; \*\* p<0.01

Pētījumā kopumā lielāko dzīvsmas pieaugumu (102.3±3.86 kg±SD) novērojām PreG12 grupai, kuri 56 dienas ilgā pētījuma laikā katru dienu saņēma vidējo (12 g) topinambūra miltu koncentrāta (t.i. 6 g inulīna) devu. Lai gan prognozējām, ka, palielinot šīs barības piedevas devu līdz 12 g inulīna diennaktī, rezultāts būs vēl labāks (lielāks diennakts dzīvsmas pieaugums), iegūtie rezultāti to neapstiprināja (PreG24 grupa 100.0±3.86 kg±SD).

Izrādījās, ka 6 g inulīna deva diennaktī (g/dnn), bija visefektīvākā, lai iegūtu lielāku dzīvsmas pieaugumu, turpretim inulīns devās 3 g/dnn un 12 g/dnn deva salīdzinoši sliktākus rezultātus. Arī Jonova ar līdzautoriem (2018) pētījumā teļiem, kuriem izbaroja, 12 g šo topinambūra miltu koncentrātu (inulīna deva

6 g/dnn) aprakstīja būtiski lielāku dzīvsvara pieaugumu, salīdzinot ar kontroles grupas dzīvniekiem. Mūsu dati sakrīt ar citu pētnieku datiem, kas pierāda, ka prebiotiku izbarošana var būtiski palielināt dzīvmasas pieaugumu teļiem (Masanetz *et al.*, 2010; Khare *et al.*, 2018; Tian *et al.*, 2019; Swedzinski *et al.*, 2019).

Mūsu pētījumā konstatējām, ka visu trīs jaunizveidotās sinbiotikas (topinambūra koncentrāts ar tā sastāvā esošo inulīnu (50%) kombinācijā ar *E. faecium*) devu saņēmušo dzīvnieku vidējais dzīvmasas pieaugums grupā, salīdzinot ar kontroles grupu, ir lielāks. Vislielāko dzīvmasas pieaugumu novēroja sinbiotiku vidējas devas (SinG12) saņēmušo dzīvnieku grupai. Šai grupai visu pētījuma laiku tika novērots stabilākais dzīvmasas pieaugums. Lai gan SinG6 sniedza zemāko dzīvsvara pieaugumu ( $100.0 \pm 2.26$  kg $\pm$ SD) starp sinbiotiku grupām, tomēr arī tas bija būtiski ( $p < 0.01$ ) augstāks nekā kontroles grupai ( $82.2 \pm 6.54$  kg $\pm$ SD). Līdzīgi to apraksta citi autori (Dabiri, 2012; Moarrab *et al.*, 2016; Dar *et al.*, 2019; Sahu *et al.*, 2019).

Analizējot kautsvaru, varam secināt, ka mūsu pētījumā visu triju topinambūra miltu koncentrātu saņēmušo grupu dzīvniekiem tas ir būtiski lielāks nekā kontroles grupai, kas liecina, ka dzīvnieki, kuriem ar barības piedevu izbaroja prebiotiku inulīns, labāk asimilēja uzņemtos barības līdzekļus. Daudzos pētījumos pierādīts, ka teļiem, kuriem tika izbarotas prebiotikas, sausnas uzņemšana ir lielāka, salīdzinot ar kontroles grupas dzīvniekiem (Morrison, 2010, Ballou, 2011, Roodposhti un Dabiri, 2012, Ghosh un Mehla, 2012, Liu *et al.*, 2020).

Tāpat kā mūsu pētījumā arī Grun ar līdzautoriem (2013), izbarojot teļiem prebiotikas, panāca lielāku kautsvara iznākumu. Autori lielāku dzīvmasas pieaugumu un lielāku kautsvara iznākumu skaidro ar to, ka teļiem, kuriem tika izbarotas prebiotikas, notiek labāka barības uzņemšana un sagremošana.

### **Dažādu devu topinambūra koncentrāta un sinbiotikas izbarošanas ietekme uz teļu spurekļa un glumenieka morfometriskajiem un masometriskajiem mērījumiem 12 nedēļas veciem teļiem**

Lai noskaidrotu izbaroto barības piedevu ietekmi uz teļu attīstību, pētījumam noslēdzoties veicām spurekļa un glumenieka morfometrisko un masometriskos mērījumus.

Visu topinambūra miltu koncentrātu saņēmušo dzīvnieku grupu tukša spurekļa masa ir lielāka (vidēji  $1.26 \pm 0.13$  kg $\pm$ SD) salīdzinot ar KoG ( $1.00 \pm 0.14$  kg $\pm$ SD), kas sakrīt ar pētījuma datiem, kur izbarojot barības piedevas panāca lielāku spurekļa masas attīstību (Górka *et al.*, 2011).

Spēcīgāku *saccus ventralis* muskuļslāņa attīstību konstatējām PreG12 un SinG24 grupām - vidēji mērījumi PreG12 ( $427.2 \pm 136.89$   $\mu$ m $\pm$ SD) un SinG24 ( $516.4 \pm 110.43$   $\mu$ m $\pm$ SD) salīdzinot ar KoG teļiem ( $383.6 \pm 142.11$   $\mu$ m $\pm$ SD) bija būtiski lielāki. Spurekļa *saccus ventralis* kārpīņu garums, kas tiek nodarbināts

gremošanas un uzsūkšanās procesos, konstatējām grupām, kurām izbarojām lielāku topinambūra miltu koncentrāta devu (PreG24  $937.8 \pm 479.69$  un SinG24  $1067.0 \pm 570.93 \mu\text{m} \pm \text{SD}$ ), un tās ir būtiski garākas ka kontroles grupai (KoG  $831.6 \pm 485.77 \mu\text{m} \pm \text{SD}$ ). Iespējams, ka topinambūra miltu koncentrāts, veicinājis spurekļa audu attīstību, jo nodrošināja to ar nepieciešamajām barības vielām un enerģiju. Tomēr šis apgalvojums nav viennozīmīgs, jo pilna spurekļa masas mērījumi visam grupām ir līdzīgi un būtiskas atšķirības šajos mērījumos netika konstatētas (2. tabula).

Mūsu pētījums parāda, ka topinambūra miltu koncentrāts ar sastāvā esošo prebiotiku inulīns saņēmušiem 12 nedēļas veciem teļiem arī glumenieka masa ir lielāka, salīdzinot ar kontroles grupas dzīvniekiem. Vismazākā glumenieka masa ir kontroles grupai, kuras teļi saņēma zemāko topinambūra miltu koncentrāta devu (PreG6) un visu triju devu jaunizveidotās sinbiotikas grupām. Attiecīgi, relatīvā kuņģa masa pret kautsvaru šīm pētījuma grupām ir vislielākā. Teļu grupām, kuras saņēma vidējas un augstas devas topinambūra miltu koncentrātu, glumenieka masa ir vidēji par 100 g smagāka (vidēji grupā  $660 \pm 0.06 \text{ g} \pm \text{SD}$ ). Tomēr varam runāt tikai par tendenci, jo šī atšķirība neizrādījās statistiski būtiska.

Lai gan Beharka ar līdzautoriem (1998) atzīmē, ka glumenieka masu neietekmē rupjās barības uzņemšana, taču citi autori pieļauj, ka dzīvniekiem, kuri kopā ar pienu saņēma prebiotiku inulīns (mūsu gadījumā topinambūra miltu koncentrātu), glumeniekā izveidojas blīvāks kazeīna receklis, kas tiek pārstrādāts ilgāk (Mirand *et al.*, 2019). Ar to varam skaidrot arī lielāku pilna glumenieka masu topinambūra miltu koncentrāta teļu grupām (PreG6, PreG12, PreG24), jo Mirand (2019) pētījumā pierādīts, ka kazeīna koagulāts, kas veidojas no kazeīna recekļa, kuņģī paliek līdz kuņģa iztukšošanās ir noslēgusies.

Līdzīgu tendenci novērojām arī jaunizveidotās sinbiotikas grupas teļiem. Vidējas un augstas devas sinbiotiku teļu grupām tukša glumenieka masa bija skaitliski (tomēr nebūtiski) lielāka kā KoG, taču mazāko sinbiotikas devu saņēmušās grupas teļiem (SinG6) tā bija mazāka. Iespējams tas bija tāpēc, ka barības piedevai klātesošā probiotika *Enterococcus faecium* inulīnu savām vajadzībām sāk izmantot jau spureklī, līdz ar to tas nonāk glumeniekā mazākā apjomā un nespēj izveidot tik blīvu kazeīna recekli, kā tikai topinambūra miltu koncentrātu saņēmušo teļu grupām.

**Barības piedevu izbarošanas ietekme uz teļu kautsvaru, spurekļa un glumenieka masas rādītājiem 12 nedēļu veciem teļiem/  
The influence on calf carcass weight, rumen and abomasum weight of feeding feed additives in 12-week-old calves**

Grupa/ Group (n=70)	Kautsvars/ ^Carcass weight ( $\bar{x}\pm SD$ ; kg)	Tukša kuņģa nodalījuma masa/ Empty stomach compartments weight ( $\bar{x}\pm SD$ ; kg)		Tukša kuņģa nodalījuma relatīvā masa (% pret kautsvaru $\pm SD$ )/ Empty stomach compartments relative weight (% against carcass weight $\pm SD$ )	
		spureklis/ rumen	glumenieks/ abomasum	spureklim/ rumen	glumeniekam/ abomasum
KoG	42.60 $\pm$ 6.88	1.00 $\pm$ 0.14	0.57 $\pm$ 0.07	2.42 $\pm$ 0.65	1.35 $\pm$ 0.14
PreG6	44.80 $\pm$ 0.99	1.12 $\pm$ 0.16	0.64 $\pm$ 0.04**	2.50 $\pm$ 0.35	1.44 $\pm$ 0.08
PreG12	51.40 $\pm$ 2.76**	1.30 $\pm$ 0.15**	0.68 $\pm$ 0.07**	2.53 $\pm$ 0.32	1.32 $\pm$ 0.15
PreG24	54.00 $\pm$ 2.89**	1.36 $\pm$ 0.07**	0.66 $\pm$ 0.06**	2.53 $\pm$ 0.21	1.23 $\pm$ 0.12*
SinG6	49.70 $\pm$ 2.41**	1.25 $\pm$ 0.16**	0.56 $\pm$ 0.08	2.52 $\pm$ 0.35	1.12 $\pm$ 0.14**
SinG12	52.30 $\pm$ 1.62**	1.35 $\pm$ 0.10**	0.62 $\pm$ 0.10*	2.59 $\pm$ 0.24	1.19 $\pm$ 0.20*
SinG24	49.60 $\pm$ 1.85**	1.29 $\pm$ 0.22**	0.60 $\pm$ 0.08*	2.60 $\pm$ 0.49	1.21 $\pm$ 0.15*

^ - carcass weight before chilling; \* p<0.05; \*\*p<0.01

Mūsu pētījumā teļi, kuri saņēma augstas un vidējas devas topinambūra miltu koncentrātu un arī tā kombināciju ar probiotiku *E.faecium* sasniedza lielāku ķermeņa masu, kopējo gremošanas kanāla masu. Šiem dzīvniekiem, spurekļa kārpiņu un spurekļa muskuļslāņa slāņa mērījumi parāda, ka tie ir lielāki nekā KoG.

**Dažādu devu topinambūra miltu koncentrāta un sinbiotikas izbarošanas ietekme uz spurekļa kārpiņu izmēru un muskuļslāņa biezumu 12 nedēļas veciem teļiem**

Spurekļa kārpiņu garumu un platumu mērījumi tiek izmantoti, lai noteiktu spurekļa relatīvo attīstību (Lesmeister *et al.*, 2004). Mūsu pētījumā visgarākās spurekļa *saccus ventralis* kārpiņas tika novērotas PreG24 grupas dzīvniekiem (937.8 $\pm$ 479.69  $\mu\text{m}\pm SD$ ) vismazākās PreG6 grupas teļiem (818.3 $\pm$ 485.05  $\mu\text{m}\pm SD$ ), bet PreG12, SinG6, SinG12 un SinG24 grupu kārpiņas bija garākas nekā KoG (831.4 $\pm$ 300.99  $\mu\text{m}\pm SD$ ) teļiem.

Viena no iespējamībām, kāpēc tā notiek varētu būt tas, ka prebiotikas veicina gaistošo taukskābju veidošanos, jo gala produkts, kas veidojas sagremojot prebiotikas, ir gaistošās taukskābes (Kaufhold *et al.*, 2000), kas tālāk ietekmē gremošanas enzīmu darbību arī zarnās. Gaistošo taukskābju butriātu enterocīti

izmanto kā enerģijas avotu veicinot šūnu proliferāciju, diferencēšanos, un uzlabo zarnu barjeru funkcijas. Tas veicina garāku zarnu bārkstiņu un kriptu attīstību (Long *et al.*, 2000; Samanta *et al.*, 2013; Ghosh un Mehla, 2012). Izbarojot prebiotikas, tās palielina zarnu bārkstiņu garumu, palielina zarnu bārkstiņu uzsūkšanas spēju kapacitāti un uzlabo barības vielu uzsūkšanos zarnās, jo palielnās zarnu gļotādas virsmas uzsūkšanās laukums. Mūsu pētījumā skaidri iezīmējas, ka dzīvnieku grupām, kurām tika izbarotas prebiotiku - vidējās un augstās devās, bija lielāks svāra pieaugums un garākas *jejunum* zarnas bārkstiņas, nekā arī spurekļa *saccus ventralis et dorsalis* kārpiņas.

Konstaējām, ka tiem teļiem, kuri pie piena saņēma topinambūra miltu koncentrāta vidējo devu (PreG12) ir visgarākas *jejunum* bārkstiņas ( $594.3 \pm 151.42 \mu\text{m} \pm \text{SD}$ ), bet KoG ( $465.7 \pm 127.29 \mu\text{m} \pm \text{SD}$ ) visīsākās. Costa ar līdzautoriem (2019) garāku kārpiņu attīstību zarnās skaidro, ka dzīvniekiem ir pieejams enerģijas daudzums, ko izmantot, lai spurekļa un zarnu audi varētu labāk attīstīties un atjaunoties. Arī mūsu pētījums, pierāda, ka prebiotiku (mūsu pētījumā inulīna) izbarošana kopā ar pienu veicina teļu ātrāku augšanu, attīstību un adaptāciju pārejā uz rupjo barību. Mūsu pētījums arī pierāda, ka teļiem periodā, kad tie no piena pāriet uz rupjās barības uzņemšanu, prebiotikas inulīns izbarošana var vecināt un palīdzēt vieglāk adaptēties un pielāgoties jaunajiem barības līdzekļiem.

### **Dažādu devu topinambūra koncentrāta un tā sinbiotikas izbarošanas ietekme uz dažādu gremošanas kanāla daļu satura pH 12 nedēļas veciem teļiem**

Kā zināms spureklī, tiek novērotas vairāk nekā 150 dažādas mikroorganismu sugas, kuras šķeļ ogļhidrātus, proteīnus un šķiedrvielas. Šķiedrvielas šķeļošās baktērijas visefektīvāk darbojas pie pH 6.2-6.8, bet cieti šķeļošajām baktērijām vairāk piemērota skābāka vide pH 5.2-6.0. Laba barošanas prakse nosaka, ka optimālākā spurekļa pH kompleksai barības šķeļšanai vajadzētu būt no 5.8-6.4, lai sagremošanas procesi notiktu normāli (Highfill un Lalman, 2005). Prebiotikām ir liela loma dažādu minerālvielu uzsūkšanās procesā un transportēšanā. Tās palielina gaistošo taukskābju produkciju, palielinot, piemēram, butriātru veidošanos. Nodrošinot zarnu epitēlija šūnas ar enerģijas avotu tiek uzlabota zarnu uzsūkšanās spēja (Singh *et al.*, 2017). Pētījumos ar prebiotiku polisaharīdu beta glukānu tika panākta spurekļa vides pH paaugstināšana un barības vielu labāka sagremošana (Kim *et al.*, 2011).

Mūsu pētījumā KoG izrādījās visskābākā spurekļa vide, bet vājāk skāba (pH  $6.45 \pm 0.38$ ) PreG12 grupas dzīvniekiem. Rezultāti liecina, ka teļiem, kuri saņēma mazāko devu topinambūra miltu koncentrātu, kas satur 3 g prebiotiku inulīnu, spurekļa pH līmenis ir līdzīgs, kādu to konstatējām kontrolgrupas pH līmenim (pH  $5.7 \pm 0.60$ ). Varam secināt, ka šāda prebiotikas inulīna (3 g/dnn) deva nenodrošina literatūrā aprakstīto optimālu spurekļa satura pH līmeni.

Dzīvniekiem, kuriem, tika izbarota uz pusi lielāka prebiotikas inulīns deva (6 g/dnn) tika konstatēts būtiski ( $p < 0.05$ ) augstāks spurekļa vides pH līmenis (vidēji pH  $6.1 \pm 0.39$ ) nekā 3g/dnn inulīna grupai. Pētot atgremotājdzīvniekus, būtiski saprast izmaiņas spurekļa pH mērījumos, kur notiek primāra barības sagremošana un fermentācija, kas pieaugušiem atgremotājdzīvniekiem būtiski ietekmē viņu veselības stāvokli un gremošanas procesus. Šis pH līmenis nodrošina literatūrā minēto optimālo vidi šķiedrvielu un cietes šķelšanai (Highfill un Lalman, 2005).

Attiecībā uz grupām, kuru dzīvnieki pie piena saņēma jaunizveidoto sinbiotiku, konstatējām, ka pH teļu spureklī bija vidēji  $6.01 \pm 0.45$  līmenī, kas izrādījās nedaudz augstāks nekā kontroles grupai. Mūsu pētījumā, kur sinbiotikas sastāvā bija inulīns un *Enterococcus faecium*, pH līmenis spureklī tiecās tuvāk neitrālam pH līmenim. Lai gan skaitliski novērojām būtiskas atšķirības glumenieka vides pH mērījumos SinG un KoG, tomēr tās nevaram uzskatīt par fizioloģiski būtiskām, jo glumenieka iekšējās vides pH savārtījās no 3.50 līdz 3.68 vērtībām, kas ir raksturīgais skābju/sārnu līdzsvars glumeniekā. Tievo zarnu satura pH svārstījās no 7.67 līdz 7.94 vienībām. Tāpat arī resnās zarnas *colon* satura svārstības no 7.02 līdz 7.5 pH vienībām liecināja vairāk par vāji sārmainu reakciju, kas ir raksturīgs pH līmenis *colon* vidē.

### **Tukšās zarnas (*jejunum*) mikroskopiskie mērījumi teļiem 12 nedēļu vecumā**

Mērot tievo zarnu *jejunum* bārkstiņas, konstatējām, ka tās ir būtiski garākās topinambūra miltu koncentrātu un jaunizveidotās sinbiotikas saņēmušo teļu grupām nekā kontroles grupai (3.tabula). Garākas un platākas bārkstiņas tievajās zarnās palielina barības vielu uzsūkšanos un veicina teļu augšanu un attīstību, par ko liecināja citi mērījumi. Caspary (1992), apraksta, ka, ja zarnu bārkstiņas ir garākas, tad palielinās arī zarnu virsmas laukums un notiek labāka barības vielu uzsūkšanās. Līdzīgas domās ar viņiem ir Xu ar līdzautoriem (2003), kuri apraksta, ka dzīvniekiem, kuriem ir īsākas zarnu bārkstiņas, zarnās samazinās uzsūkšanās funkcijas un palielinās sekretorās funkcijas, kas rezultējas ar dzīvnieku lēnāku attīstību.

**Tukšās zarnas vidusdaļas bārkstiņu garuma, platuma un muskuļslāņa vidējo vērtību salīdzinājums 12 nedēļu veciem teļiem/  
Comparison of mean values of villi length, width and muscle layer in the middle of the jejunum in 12-week-old calves (n = 70)**

Grupa/ Group	Bārkstiņu garums/ Villus height ( $\bar{x} \pm SD$ ; $\mu\text{m}$ )	Bārkstiņu platums/ Villus width ( $\bar{x} \pm SD$ ; $\mu\text{m}$ )	Muskuļslāņa biezums/ Muscle layer thickness ( $\bar{x} \pm SD$ ; $\mu\text{m}$ )
KoG	465.7±127.29	55.4±10.51	157.6±53.20
PreG6	523.4±120.41**	63.0±15.58**	158.3±47.38
PreG12	594.3±151.42**	64.0±17.67**	118.2±53.11**
PreG24	532.3±196.97**	58.1±16.00	141.8±43.24*
SinG6	483.1±132.63	62.9±13.00**	134.9±33.00**
SinG12	566.1±144.68**	63.4±15.35**	113.2±26.23**
SinG24	489.2±135.76**	66.7±18.06**	149.7±49.45

\*būtiska atšķirība ar /significant difference with KoG (p<0.05);

\*\* būtiska atšķirība ar / significant difference with KoG (p<0.01)

Mūsu pētījumā, teļiem, kuri saņēma papildus barības piedevas, bija būtiski lielāks dzīvsvāra pieaugums un *jejunum* bārkstīņu garums. Iepējams, ka šo garāko (salīdzinot ar KoG) bārkstīņu dēļ, palielinājās uzsūkšanās laukums zarnās (3.tabula). Uzlabojot zarnu morfoloģisko attīstību, uzlabojas ne tikai barības absorbcija un sagremošana, bet arī dzīvnieku spēja pasargāt sevi no patogēno baktēriju ierosinātām infekcijām (Dimitroglou *et al.*, 2009).

**Topinambūra koncentrāta un tā sinbiotikas izbarošanas ietekme uz loka zarnas (*colon*) kriptu dziļumu loka zarnas gļotādā teļiem 12 nedēļu vecumā**

Veicot *colon* kriptu dziļumu mērījumus konstatējām, ka mūsu veiktā pētījuma teļiem, kuri bija apmēram 84 dienas jauni, topinambūra miltu koncentrātu un tā sinbiotiku saņēmušo teļu grupām ir būtiski seklākas *colon* kriptas nekā KoG teļiem (592.5±145.5  $\mu\text{m} \pm \text{SD}$ ). Izvērtējot kriptas dziļumus resnajā zarnā *colon*, noskaidrojām, ka gan PreG, gan SinG grupu dzīvniekiem kriptas ir seklākas nekā KoG. Dziļākās *colon* kriptas no PreG grupu teļiem bija PreG6 (532.5±86.39  $\mu\text{m} \pm \text{SD}$ ), bet no SinG teļu grupām SinG6 grupai (534.9±126.62  $\mu\text{m} \pm \text{SD}$ ). Tas ir līdzīgi rezultātiem, ko apraksta Fleige ar līdzautoriem (2007), kuri teļiem izbaroja laktulozi kopā ar *E.faecium*.



**Loka zarnas kriptu dziļums 12 nedēļas veciem teļiem /  
The depth of colon crypt in 12-week-old calves (n = 70)**

Grupa/ Group	Loka zarnas kriptu dziļums/ Colon crypt depth ( $\bar{x}\pm SD$ ; $\mu\text{m}$ )	Būtiskuma līmenis, salīdzinot ar KoG/ Significance level compared to KoG
KoG	592.5 $\pm$ 145.50	-
PreG6	532.5 $\pm$ 86.39	p<0.001
PreG12	531.0 $\pm$ 110.97	p<0.001
PreG24	521.5 $\pm$ 101.50	p<0.001
SinG6	534.9 $\pm$ 126.62	p<0.001
SinG12	516.4 $\pm$ 107.52	p<0.001
SinG24	493.8 $\pm$ 98.86	p<0.001

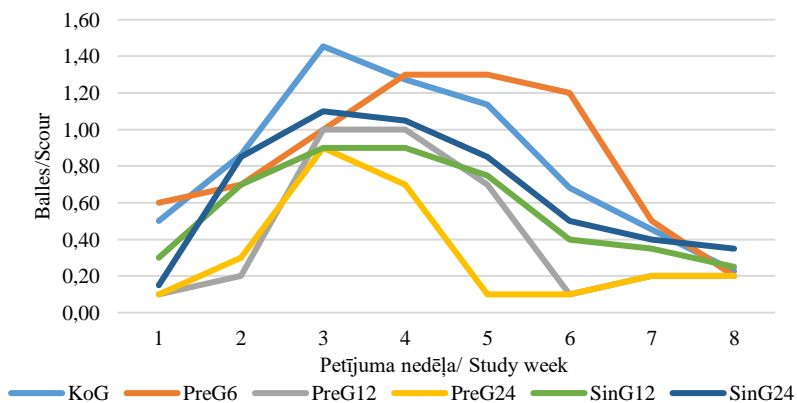
Ka zināms apoptoze ir nozīmīga gremošanas kanālam, jo tā ir atbildīga par šūnu atjaunošanās balansu, nodrošinot šūnu gan proliferāciju gan bojāeju, un ir būtisks process normālai šūnu morfoloģijai un funkcijai (Hall *et al.*, 1994). Ir pierādīts, ka prebiotikas palielina apoptozi zarnās, lai veiktu aizsargājošu efektu no kancerogēnajām šūnām (Hughes un Rowland, 2001). Arī Klien ar līdzautoriem (2006) uzsver, ka prebiotikas pastiprina apoptozi un samazina proliferāciju. Dažādas barības piedevas, tai skaitā prebiotikas un probiotikas, uzlabo barības vielu uzsūkšanos zarnās, par ko liecina sugai raksturīgāka fekālo masu konsistence un mazāks diarejas gadījumu skaits (Xiao *et al.*, 2016). Mūsu pētījumā zarnu bārkstīņas ir garākas grupām, kuras saņēma dažādas devas PreG un SinG, un šo grupu fekālo masu konsistence ir sugai raksturīgāka, formīgāka, salīdzinot ar kontroles grupu.

**Teļu fekālo masu konsistences izmaiņas dažādos vecuma posmos**

Pētot fekālo masu konsistenci, konstatējām, ka pētījuma laikā teļu grupām, kurām inulīns tika izbarots augstākās devās (12 g/dnn un 24 g/dnn), tās bija formīgākas, sugai raksturīgākas. Starp prebiotiku saņēmušo dzīvnieku grupām netika novērotas būtiskas atšķirības fekālo masu konsistencē, kas ir līdzīgi kā citu autoru veiktajos pētījumos ar prebiotiku izbarošanu teļiem (Quezada-Mendez *et al.*, 2011; Hasunuma *et al.*, 2011; Kara *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2018; Senevirathne *et al.*, 2019).

Gan dažādu devu topinambūra miltu koncentrātu saņēmušo teļu grupām, gan kontroles grupas dzīvniekiem fekālo masu sašķidrināšanos novērojām 2. pētījuma nedēļā, kad fekālo masu sašķidrināšanos varēja ierosināt jaunās spēkbarības pievienošana barības racionam. Vēl viens iemesls fekāliju

konsistences izmaiņām šajā vecumā varētu būt tas, ka teļiem asinīs bija samazinājies antivielu (IgG) līmenis, kas tika saņemtas ar mātes pirmpienu un kas līdz šim pasargāja teļus no dažādiem nelabvēlīgiem ārējiem apstākļiem un patogēniem. Pētījuma sākumā un laika periodā, kad sāka izbarot spēkbarību, fekālo masu konsistence teļiem bija šķidrāka nekā otrajā pētījuma daļā (2. att.), jo to gremošanas sistēmas orgāniem ir jāpieņemojas jaunajiem barības līdzekļiem. Rezultāti liecina, ka pie piena pievienotais topinambūra miltu koncentrāts ar tā sastāvā esošo inulīnu palīdz pārvarēt diētas maiņu, un teļi ātrāk adaptējas jaunajiem barības līdzekļiem. Kā norāda Roodposhti ar kolēģiem (2012), resnajā zarnā labvēlīgās baktērijas prebiotikas var viegli izmantot sev dažādos fermentācijas procesos. Tas veicina to augšanu un attīstību, tādējādi nodrošinot aizsardzību no patogēnajām baktērijām (Ohland un MacNaughton, 2010).



2.att. Teļu fekālo masu konsistences novērtējums ( $\bar{x}$ ) ballēs dažādās pētījuma nedēļās (n=70)/

Fig.2 Scours of fecal mass consistency ( $\bar{x}$ ) of calves at different weeks of the study (n=70)

Ātrāka fekālo masu atgriešanās sugai raksturīgā konsistencē parāda, ka visu triju mūsu pētījumā izmantoto prebioikas devu izbarošana nodrošina sekmīgāku zarnu trakta funkcionēšanu arī barības līdzekļu maiņas gadījumā (2.att). Mūsu pētījumā sinbiotiku grupas dzīvniekiem (tāpat kā topinambūra miltu koncentrātu saņēmušo teļu grupām) fekālo masu sašķidrināšanos novērojām laikā, kad noteiktajai barības diētai pievienojām jaunu līdzekli rupja maluma spēkbarību. Rezultātā teļiem, kuriem izbaroja trīs dažādas devas sinbiotikas, tika novērotas stingrākas, sugai raksturīgākas fekālās masas nekā kontroles grupas dzīvniekiem. Tātad arī SinG grupām barības raciona izmaiņas mazināja fekālo masu

sašķidrināšanos, kas parasti rodas barības maiņas rezultātā. Grupas SinG12 teļi, kuri saņēma 12 g topinambūra miltu koncentrātu (satur 6 g/dnn inulīnu), uzrādīja visstabilāko fekālo masu konsistenci visu pētījuma laikā.

Jāatzīmē, ka probiotikas *E.faecium* pievienošana topinambūra miltu koncentrātam, kura sastāvā prebiotiku inulīns sastāda ~50%, tā izveidojot sinbiotiku, mūsu pētījumā uzlaboja fekālo masu konsistenci arī barības maiņas laikā. Visu šīs sinbiotikas triju devu izbarošana uzlaboja fekālo masu konsistenci - tās bija nedaudz stingrāka un sugai raksturīgāka nekā prebiotikas un kontroles grupu dzīvniekiem. To var skaidrot ar to, ka sinbiotikā sastāvā esošās prebiotika un probiotika darbojas sinerģiski un veicina gremošanas procesiem labvēlīgu zarnu mikroorganismu darbību, līdz ar to sugai raksturīgāku fekālo masu konsistenci (2. att.).

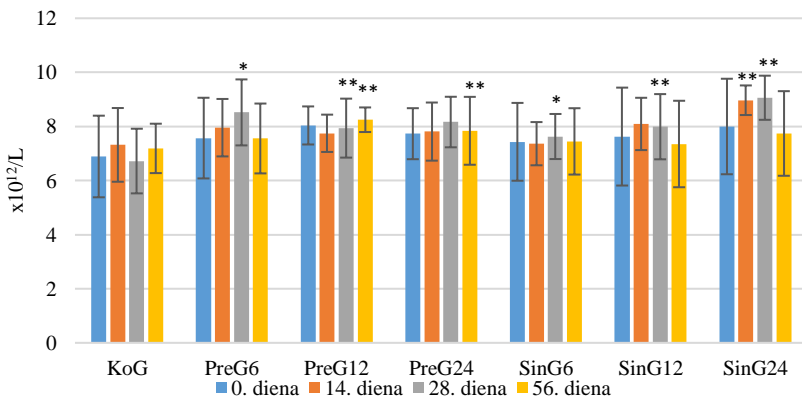
Teļiem novērtējām ne tikai fekālo masu konsistenci, bet arī citus vispārējās veselības rādītājus, tādus kā rektālā temperatūra, sirds darbības un elpošanas frekvence vienā minūtē. Jāatzīmē, ka visi šie rādītāji visu pētījuma laiku bija normas robežās un starp tiem netika novērotas būtiskas atšķirības.

#### **Hematoloģisko rādītāju izmaiņas 4 - 12 nedēļu veciem teļiem pēc dažādu devu topinambūra koncentrāta un tā sinbiotikas izbarošanas**

Mūsu un arī citu zinātnieku pētījumu laikā teļu vecums ir mainīgs, līdz ar to, kā raksta Klinkon un Ježek (2007), arī asins hematoloģisko un bioķīmisko vērtību rādītāji ir mainīgi dažādos dzīvnieku vecuma un attīstības posmos. Teļiem asins rādītāji īpaši tiek ietekmēti laikā, kad pēc piena izbarošanas sāk izbarot sienu un spēkbarību (Klinkon, Ježek, 2007).

Teļiem, kļūstot vecākiem, eritrocītu skaits palielinājās, tomēr vidējas un augstas devas topinambūra miltu koncentrātu saņēmušo teļu grupās (inulīns 6 un 12 g/dnn) tas palielinājās straujāk (3.att.). Visu pētījuma laiku dzīvniekiem, kuriem izbarojām dažādas devas topinambūra miltu koncentrātu, eritrocītu un hemaglobīna daudzums (5.att.) bija augstāks nekā KoG grupas teļiem. Ir zināms, ka galvenā eritrocītu funkcija ir gāzu transports, apgādājot šūnas ar skābekli un nodrošinot oglekļa dioksīda aizvadišanu. Par šīs funkcijas izpildi liecina pietiekams hemoglobīna līmenis eritrocītos (Awodi *et al.*, 2005).

Mūsu pētījumā būtiskākās atšķirības parādījās 28. pētījuma dienā, kad teļiem, kuriem izbarojām topinambūra miltu koncentrātu, novērojām augstāku hemaglobīna koncentrāciju (4. att).



3.att. Eritrocītu ( $\bar{x}\pm SD$ ) skaita izmaiņas teļiem (n=70) pētījumā 0., 14., 28., 56. dienā/

Fig.3 Changes in erythrocyte count ( $\bar{x}\pm SD$ ) in calves (n=70) on study days 0, 14, 28, 56

\*būtiska atšķirība ar /significant difference with KoG (p<0.05);

\*\* būtiska atšķirība ar/ significant difference with KoG (p<0.01)

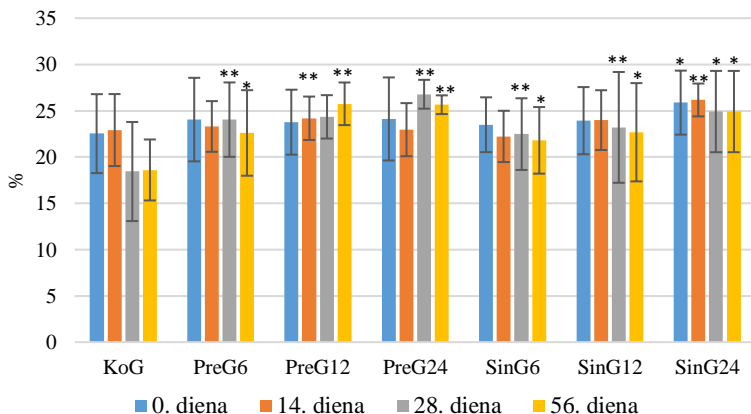
Scholz-Ahrens ar līdzautoriem (2015) pētījumā ar žurkām pierādīja, ka prebiotika inulīns spēj paaugstināt divvērtīgo metāla transportētāju 1 (DMT1) resnajā zarnā, kas ir proteīns un atbild par dzelzs jonu pārnešanu cilvēkiem un dzīvniekiem. Iespējams, ka mūsu pētījuma dzīvniekiem notika labāka dzelzs jonu absorbcija kā kontroles grupas teļiem. Zināms, ka prebiotikām inulīnam un oligofruktozei var būt pozitīva ietekme uz proteīniem, kas regulē dzelzs jonu uzsūkšanos cilvēku un dzīvnieku organismā (Marciano *et al.*, 2015).

Teļiem, kuri saņēma topinambūra miltu koncentrātu (inulīna devas 6 un 12 g/dnn) hematokrīta (4. att.) un hemaglobīna rādītāji (5.att.) bija augstāki, kas varētu liecināt par labāku dzelzs absorbciju.

Kontroles grupas teļiem HCT pētījuma 28. un 56.dienā bija zem normas robežas, kas liecina par zemāku dzelzs absorbciju.

Masanetz ar kolēģiem (2011) pētījumā ne tikai konstatējās būtiskas atšķirības starp prebiotiku grupas dzīvniekiem un kontroles grupu kopējā eritrocītu daudzumā, bet arī novēroja būtisku atšķirību hemoglobīna līmenī teļiem, kuriem izbaroja inulīnu. Tas bija būtiski augstāks kā kontroles grupai un grupām, kurām izbaroja laktulozi. Tas sakrīt ar mūsu pētījuma datiem, konstatējām, ka vidējās

un augstas devas topinambūra miltu koncentrāta izbarošana, kas saturēja inulīnu 6 vai 12 g, būtiski paaugstina hemaglobīna līmeni (5.att.).



#### 4.att. Hematokrīta ( $\bar{x}\pm SD$ ) mērījumu izmaiņas teļiem (n=70) pētījumā 0., 14., 28., 56. dienā/

Fig.4 Changes in hemocryte count ( $\bar{x}\pm SD$ ) in calves (n=70) on study days 0, 14, 28, 56

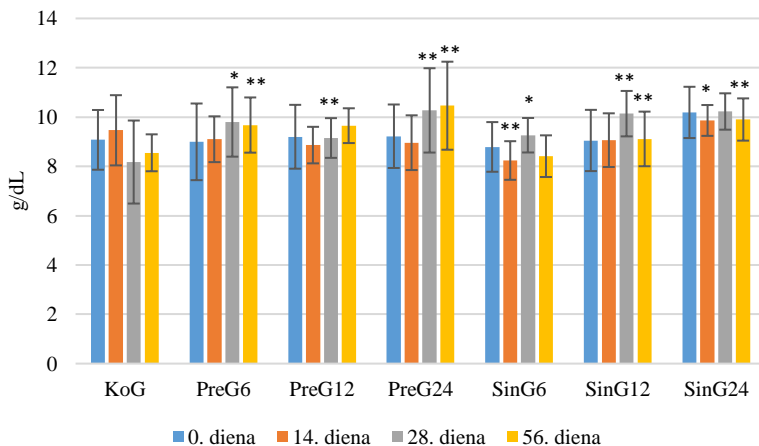
\*būtiska atšķirība ar /significant difference with KoG ( $p<0.05$ );

\*\* būtiska atšķirība ar/ significant difference with KoG ( $p<0.01$ )

Jāmin, ka Klinkon un Ježek (2007) apraksta, ka, sākot uzņemt rupjo barību, teļiem asinīs eritrocītu daudzums palielinās, kas mūsu pētījumā tiek novērots PreG12 un PreG24 un visām SinG grupām, taču ne KoG.

Mūsu pētījumā sinbiotiku (SinG12 un SinG24) grupām HGB un HCT rādītāji ir augstāki nekā KoG, turklāt SinG12 grupai hemaglobīns ( $p<0.01$ ) bija augstāks jau no 28. pētījuma dienas.

Roland ar līdzautoriem (2014) aprakstījis, ka teļiem hemoglobīna un hematokrīta līmenis samazinās pirmajos dzīves mēnešos un sākot ar trešo dzīves mēnesi atkal palielinās, ko novērojām arī mūsu pētījumā visām teļu grupām, kurām papildus izbarojām barības piedevas.



5.att. Hemaglobīna ( $\bar{x}\pm SD$ ) daudzuma izmaiņas teļiem ( $n=70$ ) pētījuma 0., 14., 28., 56. dienā/

*Fig.5 Changes in hemoglobin ( $\bar{x}\pm SD$ ) in calves ( $n=70$ ) on days 0, 14, 28, 56 of the study*

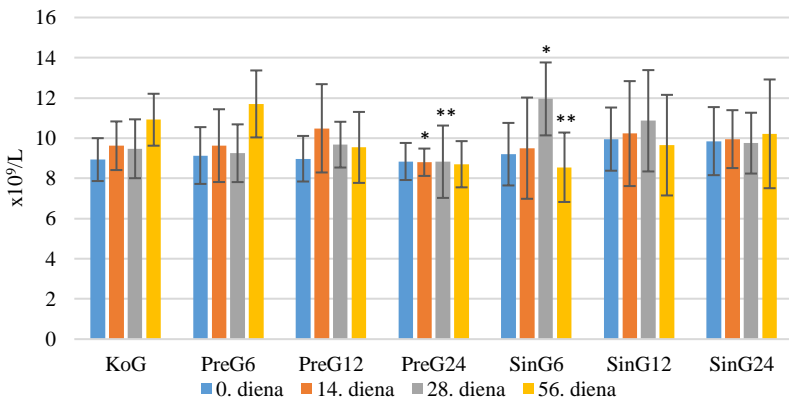
\*būtiska atšķirība ar /significant difference with KoG ( $p<0.05$ );

\*\* būtiska atšķirība ar / significant difference with KoG ( $p<0.01$ )

Tomēr jāpiemin, ka Azimzadeh ar līdzautoriem (2016) nekonstatēja būtiskas atšķirības eritrocītu skaita un hemoglobīna līmenī asinīs starp sinbiotiku un kontroles grupu dzīvniekiem.

Ir izpētīts, ka arī sinbiotikas palīdz uzsūkties dažādam minerālvielām, tai skaitā dzelzim (Ahmad *et al.*, 2021). Tas varētu būt iemesls augstākam hemoglobīna līmenim sinbiotiku saņēmušajiem teļiem.

Leikocītu paaugstināšanās var liecināt par infekcijas attīstību, arī stress var paaugstināt to daudzumu. Ir pierādīts, ka prebiotikām piemīt imūnsistēmu stimulējoša darbība (Seifert un Waltz, 2007), kas ietekmē leikocītu daudzumu asinīs. Mūsu pētījumā visu grupu dzīvniekiem 56. dienā limfocītu bija vairāk nekā 0 dienā.



6.att. Leikocītu ( $\bar{x}\pm SD$ ) skaita izmaiņas teļiem ( $n=70$ ) pētījuma 0., 14., 28., 56. dienā/

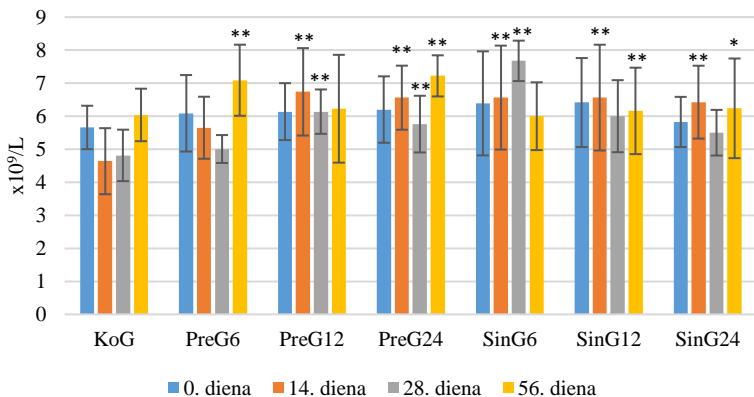
Fig.6 Changes in leukocyte ( $\bar{x}\pm SD$ ) counts in calves ( $n=70$ ) on study days 0, 14, 28, 56

\*būtiska atšķirība ar /significant difference with KoG ( $p<0.05$ );

\*\* būtiska atšķirība ar / significant difference with KoG ( $p<0.01$ )

Grupām, kurām izbarojām augstāko devu topinambūra miltu koncentrātu un tā kombināciju ar probiotiku (PreG24 un SinG24), visa pētījuma laikā nenovērojam krāsas leikocītu daudzuma izmaiņas, bet kontroles grupai un zemāko prebiotikas devu saņēmušajiem (PreG6) dzīvniekiem, to bija vairāk pētījuma beigu posmā. Lai arī dažādās pētījuma dienās starp kontroles un pētāmo teļu grupām tika konstatētas statistiski būtiskas atšķirības leikocītu vidējo rādītāju izmaiņās, tomēr nevienai no grupām tās nebija ārpus references robežām. Nevaram apgalvot, ka topinambūra miltu koncentrātā izbarošana ietekmētu leikocītu skaitu. Król (2011) apraksta, ka leikocītu skaits palielinās jo, zarnās rodas iekaisuma reakcijas atbilde uz augsto prebiotika devu. Arī El-Mehanna ar līdzautroiem (2017) savā pētījumā atklāja, ka kopējais leikocītu skaits prebiotiku un sinbiotiku grupas dzīvniekiem ir augstāks nekā kontroles grupai, kas apstiprinātu šo teoriju.

Mūsu pētījumā topinambūra miltu koncentrātu saņēmušo teļu grupām visā pētījuma laikā tika novērots augstāks limfocītu skaits, salīdzinot ar KoG grupas dzīvniekiem. Iespējams tas tāpēc, ka prebiotikas varētu būt tās, kas ir spējīgas ietekmēt zarnu gļotādas imunitāti un nodrošināt veselu organismu kopumā.



7.att. Limfocītu ( $\bar{x}\pm SD$ ) skaita izmaiņas teļiem (n=70) pētījumā 0., 14., 28., 56. dienā/

Fig.7 Changes in lymphocyte ( $\bar{x}\pm SD$ ) counts in calves (n=70) on study days 0, 14, 28, 56

\*būtiska atšķirība ar /significant difference with KoG ( $p<0.05$ );

\*\* būtiska atšķirība ar / significant difference with KoG ( $p<0.01$ )

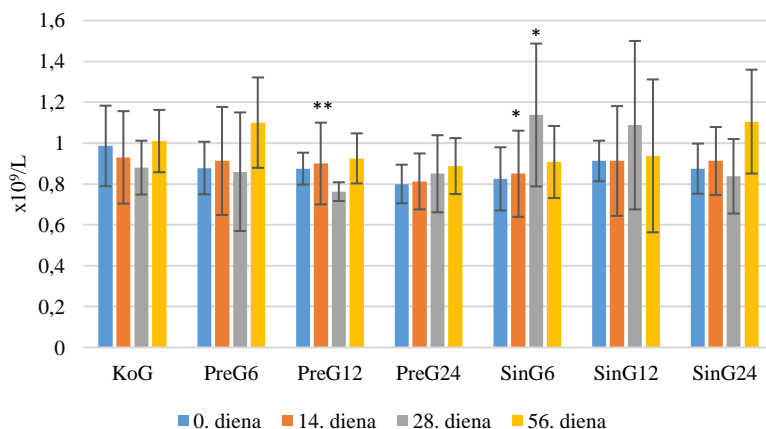
Dar ar līdzautoriem (2017) pētījumā aprakstīja, ka limfocītu skaits prebiotiku un sinbiotiku grupas dzīvniekiem bija būtiski augstāks nekā kontroles grupai, kas tika skaidrots ar imunitātes celšanos un imūnatbildes reakcijas veidošanos. Mūsu pētījumā sinbiotiku grupām līdz 56. dienai ir augstāks limfocītu skaits, bet pētījumam noslēdzoties (56. dienā). KoG limfocītu ir nedaudz vairāk kā SinG6, bet mazāk kā SinG12 un SinG24 grupām. Pētījumā kopumā sinbiotiku grupām konstatējām augstāku limfocītu skaitu un, iespējams, spēcīgāku imunitāti.

Attiecībā uz monocītu daudzumu asinīs jāatzīmē, ka visu pētījuma laiku visām grupām to skaits bija augstākajās references robežās vai tās pārsniedza. Jāatzīmē, ka prebiotiku grupu teļiem to skaits bija zemāks nekā kontroles grupas teļiem. Salīdzinoši zemāko skaitu novērojām grupai, kuras dzīvnieki saņēma augstāko topinambūra koncentrāta teļiem (PreG24 grupai).

Lai arī monocītu skaita vidējās vērtības starp grupām, atsevišķos gadījumos parādīja statistiski būtisku atšķirību, tam nav fizioloģiskas nozīmes, jo to skaita svārstības bija starp  $0.8$  un  $1.1 \times 10^9/L$ , ko nevaram uzskatīt par fizioloģiski nozīmīgām.



Trombocītu daudzums topinambūra miltu koncentrātu un tā sinbiotiku saņēmušo grupu teļiem visu pētījuma laiku, salīdzinot ar kontroles grupas dzīvniekiem, bija augstāks. Izpētīts, ka trombocītu skaits teļiem strauji pieaug pirmajās divās dzīves nedēļās, un tad nākamajos trijos mēnešos pieaugams vairs nav tik straujš (Roland *et al.*, 2014).



8.att. Trombocītu ( $\bar{x}\pm SD$ ) skaita izmaiņas teļiem (n=70) pētījuma 0., 14., 28., 56. dienā/

Fig.8 Changes in platelet count ( $\bar{x}\pm SD$ ) in calves (n=70) on study days 0, 14, 28, 56

\*būtiska atšķirība ar /significant difference with KoG (p<0.05);

\*\* būtiska atšķirība ar/ significant difference with KoG (p<0.01)

No 0. līdz 28. pētījuma dienai salīdzinoši augstāks trombocītu līmenis (PLT  $\times 10^9/L$ ) tika novērots KoG grupas dzīvniekiem. Pētījuma 14. un 28. dienā visu topinambūra miltu koncentrātu saņēmušo teļu grupām trombocītu vidējais daudzums bija būtiski (p<0.01) zemāks nekā kontroles grupai. Jaunizveidotās sinbiotikas grupām arī novērojām būtiski (p<0.01) zemāku vidējo trombocītu skaitu šajā laika periodā. SinG teļu grupām novērojām augstāku PLT skaitu kā PreG. Noslēdzot pētījumu (56.dienā), konstatējām, ka visu grupu teļiem vidējo trombocītu skaits grupā samazinājies. Starp dažādu devu barības piedevu saņēmušo grupu teļiem un KoG būtiskas atšķirības netika atrastas.

## **Asins bioķīmisko rādītāju izmaiņas 4 - 12 nedēļu veciem teļiem pēc dažādu devu topinambūra miltu koncentrāta un tā sinbiotikas izbarošanas**

Kopējā proteīna (KP) līmeņa noteikšana ir ļoti svarīga daudzu slimību un organisma darbības traucējumu diagnostikā. Atgremotājiem ne tikai vecums, bet arī izvēlēta barība un iekaisumu procesi var ietekmēt KP koncentrāciju asins plazmā (Kaneko, 1997; Kraft, Dürr, 1999c; Shil *et al.*, 2012).

Postnatālās attīstības laikā tieši teļu vecums tiek minēts kā galvenais faktors, kas ietekmē kopējā proteīna līmeni asins plazmā, uzsverot, ka teļiem tas ir zemāks nekā govīm (Kaneko *et al.*, 1997; Shil *et al.*, 2012).

Visu mūsu pētījuma grupu teļiem KP līmenim ir tendence pieaugt, teļiem kļūstot vecākiem. Salīdzinot KP līmeni uzsākot pētījumu, t.i. 21 dienu veciem teļiem un, noslēdzot pētījumu, t.i. pēc 56 dienām, visu barības piedevu saņēmušo teļu KP līmenis asins plazmā ir augstāks kā kontroles grupas dzīvniekiem. Kā izņēmumu jāmin 28. pētījuma diena, kad visu grupu dzīvniekiem KP līmenis bija zemāks nekā 14. pētījuma dienā. To varam skaidrot ar fekālo masu sašķidrināšanos no 14. līdz 28. pētījuma dienai

Mūsu pētījumā PreG24 grupas teļiem, kuri saņēma augstāko topinambūra miltu koncentrāta devu (inulīns 12 g/dnn), KP līmenis bija būtiski augstāks ( $p < 0.01$ ) kā kontroles grupas dzīvniekiem. Noslēdzot pētījumu arī PreG12, SinG6 un SinG12 grupām kopējā proteīna daudzums asins plazmā ir būtiski ( $p < 0.01$ ) augstāks kā KoG, kas varētu norādīt uz iespējami labāku proteīna uzsūkšanos gremošanas kanālā.

Tā kā albumīni pārsvarā tiek sintezēti aknās, to daudzums ir atkarīgs no aknu brieduma un funkcionālajām spējām (Steinhardt un Thilescher, 2000c). Zemāka albumīna koncentrācija asins plazmā veselīgiem dzīvniekiem varētu būt nepietiekamas aminoskābju piegādes sekas (Whitaker, 1997). Mūsu pētījumā visām pētāmo dzīvnieku grupām albumīns viszemāko līmeni asins plazmā sasniedza 28. pētījuma dienā jeb 42. dienu veciem teļiem, kas tiek novērots vienā laikā ar fekālo masu sašķidrināšanos. Tas, iespējams, varētu būt viens no galvenajiem albumīna pazemināšanās cēloņiem šajā laika posmā. Arī Klinkon un Ježek (2007) apraksta, ka albumīna pazemināšanās zem normas robežām jeb hipoalbuminēmija teļiem sastopama pie diarejām.

Jāatzīmē, ka visā mūsu pētījuma laikā visām pētāmo teļu grupām vidējais albumīna līmenis asins plazmā ir augstāks nekā normas robežas. To var skaidrot ar to, ka teļi visu pētījuma laiku saņēma pilnpienu, kas varētu nodrošināt augstāku albumīna daudzumu asins plazmā. Hiperalbuminēmiju var novērot dehidratācijas gadījumos, taču mūsu pētījuma teļiem visu pētījuma laiku HCT ir normas robežās, tāpēc izslēdzam šādu iespējamību.

Sārmainās fosfotāzes (SAP) enzīma aktivitāte pieaug, pie akūtām un hroniskām aknu slimībām, kā arī slimībām, kas skar skeleta sistēmu un kaulus

(rahīts, periostīts). Zināms, ka dzīvniekiem kļūstot vecākiem, enzīma aktivitāte samazinās, jo vairs nenotiek tik strauja augšana, un samazinās SAP līmenis (Kaneko, 1997). Knowles ar līdzautoriem (2000) apraksta, ka teļiem, sasniedzot 60 dienu vecumu, SAP līmenis asinīs samazinās un tā aktivitāte kļūst stabilāka (līdz tam enzīms koncentrācija asins plazmā ir augstāka). Līdzīgu dinamiku novērojām arī mūsu pētījumā PreG6 un visām SinG grupām, kā arī kontroles grupas teļiem. PreG12 grupas teļiem SAP samazinājās salīdzinot ar pētījuma mērījumiem uzsākot pētījumu.

Mūsu pētījumā visu grupu dzīvniekiem vidējā GGT līmeņa radītājs grupā bija normas robežās, lai gan, uzsākot pētījumu, GGT līmenis bija augstāks, bet teļiem, kļūstot vecākiem, samazinājās. Šāda dinamika atbilst vecumam raksturīgajām izmaiņām.

Glikozes līmenis mūsu pētījuma PreG12 grupai 14., 28., un 56. pētījuma dienā bija būtiski ( $p < 0.01$ ) zemāks, salīdzinot ar KoG dzīvniekiem. Visa SinG24 glikozes līmenis bija būtiski ( $p < 0.05$ ) zemāks nekā KoG. Tas bija zemāks arī salīdzinot ar teļiem, kuri pie piena saņēma topinambūra miltu koncentrāta pulveri (inulīns 3 g/dnn vai 6 g/dnn) vai tādu pašu devu kombinācijā ar *E. faecium*. Zināms, ka glikozes līmenis teļiem ir augstāks nekā govīm, ko skaidro ar to, ka teļu kuņģi sākotnēji darbojas līdzīgi kā monogastriskiem dzīvniekiem (Doornenbal *et al.*, 1988; Shil *et al.*, 2012).

### **Topinambūra koncentrāta un tā sinbiotikas izbarošanas ietekme uz loka zarnas (*colon*) imūnoglobulīna A ekspresiju loka zarnas gļotādā teļiem 12 nedēļu vecumā**

Galvenā imūnoglobulīna A (IgA) funkcija zarnās ir novērst patogēnu piestiprināšanos zarnu sienīnām, nodrošinot šūnu imunitāti un homeostāzi, jo IgA izdalās caur zarnu gļotādas virsmu (Suzuki un Nakajima, 2014). IgA ir pirmais, kas pasargā zarnu epitēliju no enteroroksīniem un patogēnajiem mikroorganismiem, veicina labvēlīgo mikroorganismu kolonizāciju. Visām topinambūra miltu koncentrāta un tā sinbiotiku saņēmušo teļu grupām IgA imūnreaktīvo šūnu ekspresija resnās zarnas *colon* gļotādā ir būtiski ( $p < 0.01$ ) lielāka, nekā kontroles grupas dzīvniekiem (5.tabula). Mūsu pētījumā iekļauto barības piedevu izbarošana, iespējams, uzlabo resnās zarnas mikrobiotu, tā uzlabojot zarnu sienīņas imūnreaktivitāti un pretošanās spējas patogēnajiem mikroorganismiem, par ko liecina lielāka IgA daudzuma ekspresija zarnu audos, jo IgA sekrēcija notiek kā atbildes reakcija baktēriju kolonizācijai (Cebra, 1999).

**Imūnglobulīna A imūnreaktīvo šūnu daudzuma izvērtējums  
RGB modeļa zilās krāsas spektrā/  
Evaluation of the amount of immunoglobulin A immunoreactive cells  
RGB model in the blue spectrum (n=70)**

Grupa/ Group	Maksimālā vērtība/ Maximal value	Minimālā vērtība/ Minimal value	Vidējā vērtība grupā/ Average value in group	Standart novirze/ Standard deviation	Būtiskuma līmenis, salīdzinot ar / Significance level compared to KoG
KoG	185	77	130.4	25.16	-
PreG6	194	94	146.7	17.94	p<0.001
PreG12	178	80	135.9	19.34	p<0.001
PreG24	200	82	129.6	22.54	p<0.001
SinG6	173	84	137.0	14.81	p<0.001
SinG12	197	75	144.2	25.41	p<0.001
SinG24	179	94	137.3	15.70	p<0.001

Mūsu pētījumā IgA viszemākā ekspresija *colon* audos tika novērota KoG, salīdzinot ar dzīvnieku grupām, kurām izbaroja topinambūra miltu koncentrātu un jaunizveidoto sinbiotiku. Vidējas devas topinambūra miltu koncentrāta deva (satur 6 g inulīnu) jeb PreG12 kombinācijā ar *E. faecium* sniedza vislabākos rezultātus, kur iespējams, resnās zarnas saturam un sienīņām labvēlīgās baktērijas varēja izmantot inulīnu savai augšanai un veicināt zarnu lokālo imunitāti.

**Grelīna imūnreaktīvo šūnu skaits un novietojums glumeniekā  
12 nedēļu veciem teļiem, kuriem 56 dienas tika izbarots dažādu devu  
topinambūra miltu koncentrāts un tā kombinācija ar probiotiku**

Viens no pētījuma uzdevumiem bija novērtēt topinambūra miltu koncentrāta vai tā kombinācijas ar *E. faecium* ietekmi uz izsalkuma un sāta sajūtu. Grelīna imūnreaktīvās šūnas konstatējām gan kontroles grupas, gan izbarojot dažādu devu topinambūra miltu koncentrāta un tā sinbiotiku 12. nedēļas vecu teļu glumeniekā. Tas papildina autoru aprakstītos pētījumus, ka grelīna IR šūnas, ir konstatētas jau teļiem divu nedēļu vecumā un pieaugšu, piecus gadus un vecāku govju glumeniekā (Hayashida *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 2020). Turklāt to daudzums glumenieka divās lielākajās daļās glumenieka *fundus* un *pars pylorica* būtiski atšķiras (6. tabula).

**Grelīna IR šūnas ( $\bar{x}\pm SD$  1mm<sup>2</sup>) glumenieka *pylorus* un *fundus* daļā  
un liemeņa masa 12 nedēļas veciem teļiem/  
*Ghrelin IR cells ( $\bar{x}\pm SD$  1mm<sup>2</sup>) abomasum *pylorus* and *fundus* part and cold  
carcase weight in 12 weeks old calves***

Grupa/ Group	Reakcijas intensitāte/ Reaction intensity		Liemeņa masa (kg±SD)/ Carcass weight (kg±SD)
	<i>pylorus</i>	<i>fundus</i>	
KoG	5±4.22	13±8.01	42.6±6.88
PreG6	0±0.07**	15±5.86	44.8±0.99*
PreG12	0±0.05**	6±4.50**	51.4±2.76**
PreG24	0±0.04**	4±3.99**	54.0±2.89**
SinG6	0±0.89**	10±3.27*	49.7±2.41**
SinG12	0±0.11**	5±2.93**	52.3±1.61**
SinG24	0±0.03**	2±0.79**	49.6±1.85**

\*p<0.05; \*\* p<0.01

Mūsu pētījumā kontroles grupas teļiem un pētāmo grupu dzīvniekiem, neskatoties uz pienam pievienoto barības piedevu veida un daudzuma, grelīna imūnreaktīvo šūnu skaits glumenieka *fundus* daļā bija būtiski lielāks nekā *pars pylorica*. Arī citi autori savos pētījumos apraksta, ka glumenieka *fundus* daļā ir daudz vairāk grelīnu saturošo šūnu, nekā *pars pylorica* (Strader un Wood, 2005; Kojima un Kangawa, 2005). Grelīns izsalkušam dzīvniekam veidojas kuņģa, atgremotājiem glumenieka, un citās gremošanas kanāla vietās - tievās un resnās zarnas (*caecum* un *colon*) epitēlija šūnās (Date, 2012). Tāpēc, lai novērtētu topinambūra miltu koncentrāta, kas satur prebiotiku – inulīns vai sinbiotikas (topinambūra miltu koncentrāta kombinācija ar *Enterococcus faecium*), dažādu devu ietekmi uz izsalkuma sajūtas rašanos teļiem, savā pētījumā pievērsāmies tieši glumenieka gļotādā esošā grelīna imūnreaktīvo šūnu skaita izmaiņām. Tas ļauj saprast un netieši izvērtēt šo piedevu dažādo devu iespējamo ietekmi uz barības pārstrādi, jo, glumeniekam iztukšojoties, sāk producēties grelīns, kas no gļotādas nokļūst perifērajā asinsritē. Grelīna IR šūnu skaits var būt kā viens no indikatoriem, kas norāda augšanu, jo ietekmē STH līmeni un arī piedalās izsalkuma un sāta sajūtas regulēšanā (Feldman, 2021). Tā kā visi dzīvnieki saņēma vienādu diētu, faktors, kas varētu ietekmēt sāta sajūtas ilgumu pēc ēšanas, ir barības pārstrāde (sagremojamība) gremošanas kanālā – jo tā ir augstāka, jo ilgāk saglabājas sāta sajūta pēc vienādas barības devas uzņemšanas. Lielākam uzņemto barības vielu daudzumam būtu jāatstāj iespaids arī uz dzīvnieku augšanu un noslēgumā uz iegūtās produkcijas - liemeņa masu

Mūsu pētījums sniedz uz šo brīdi unikālus datus par inulīna (prebiotikas) un tā kombinācijas ar 0.25 g *Enterococcus faecium* ( $2\times 10^9$  CFU/g) (sinbiotikas) saņēmušo teļu grelīna IR šūnu daudzumu glumenieka gļotādās *fundus* un *pylorus*

daļās, par greļina granulu izvietošanās vietu šūnās un to daudzumu. Teļu grupām, kurām, tika izbarotas, mazākas devas prebiotikas, greļina IR šūnu skaits atrodams salīdzinoši augstā līmenī.

Teļiem, kuriem izbaroja topinambūra miltu koncentrātu, kas satur 6 g/dnn vidējas un 12 g/dnn augstas devas inulīnu, saņemot vienādas barības devu greļina IR šūnas glumeniekā ir būtiski mazāk nekā kontroles un teļu grupām, kurām izbarojām mazākās devas topinambūra miltu koncentrātu. Tas parāda, ka 56 dienas izbarojot topinambūra miltu pulveri, vismaz 12 g/dnn, kurš satur inulīnu devā 6 g, 12 nedēļas vecam teļam būtiski uzlabojas barības uztņemšana un pārstrāde, tā samazinot izsalkuma sajūtu. Tomēr jāatzīst, ka pretēji prognozētajam 0.25 g prebiotikas *Enterococcus faecium* ( $2 \times 10^9$  CFU/g) pievienošana vidējai un augstākajai inulīna devai (6 g un 12 g) rezultāts būtiski neuzlabojās. Greļina IR šūnu daudzums, salīdzinot attiecīgo prebiotiku un sinbiotiku grupu rezultātus, neuzrādīja būtiski labākus rezultātus.

## SECINĀJUMI

1. Topinambūra miltu koncentrāta, ar tā sastāvā esošo inulīnu, vidējā un augstākā deva (12 un 24 g/dnn) un šīs prebiotikas kombinācija sinbiotikā ar 0.25 g *E. faecium* ( $2 \times 10^9$  CFU/g) visas trīs devas (6, 12 un 24 g/dnn) būtiski ( $p < 0.01$ ) uzlabo dzīvmasas pieaugumu un kautsvara iznākumu teļiem pārejas periodā par atgremotāju.
2. Topinambūra miltu koncentrāts 12 g/dnn, kā arī 0.25 g *E. faecium* kombinācijā ar topinambūra miltu koncentrātu (12 un 24 g/dnn devas) būtiski (vismaz  $p < 0.05$ ) uzlaboja spurekļa un glumenieka augšanu un attīstību, par ko liecina šo kuņģa daļu masometriskie un morfometriskie mērījumi.
3. Visu grupu dzīvnieku vispārējās veselības stāvokļa rādītājus un fekālo masu konsistenci topinambūra miltu koncentrāta un sinbiotikas izbarošana būtiski neietekmēja. Tomēr vidējas devas topinambūra miltu koncentrāta (12 g/dnn) un īpaši tādas pašas devas kombinācija ar *E. faecium* visu pētījuma laiku nodrošināja nemainīgāku un sugai raksturīgāku fekāliju konsistenci.
4. Hematoloģiskās analīzes liecina, ka vidējā un augstākā topinambūra miltu koncentrāta deva un visas trīs jaunizveidotās sinbiotikas devas būtiski (vismaz  $p < 0.05$ ) paaugstina tādus rādītājus, kā eritrocītu un limfocītu skaits, hematokrīts, bet samazina trombocītu un leukocītu skaitu. Īpaši izteikti šo tendenci novērojām 6 - 8 nedēļas veciem teļiem.
5. Vidējās un augstākās topinambūra miltu koncentrāta devas (12 g un 24 g) izbarošana būtiski (vismaz  $p < 0.05$ ) paaugstina kopējā proteīna un gamma glutamiltransferāzes, bet samazina sārmainās fosfatāzes, glikozes un albumīna līmeni asinīs 8 - 12 nedēļu veciem teļiem. Sinbiotikas zemākās un vidējās devas izbarošana būtiski ( $p < 0.01$ ) palielina kopējā proteīna līmeni, bet

būtiski ( $p < 0.05$ ) samazina sārmainās fosfatāzes aktivitāti teļiem 12 nedēļu vecumā.

6. Topinambūra miltu koncentrāta vidējās (12 g/dnn) un augstākās (24 g/dnn) devas izbarošana būtiski paaugstināja ( $p < 0.05$ ) spurekļa vides pH līmeni, salīdzinot ar kontroles grupas teļiem, tā veidojot celulolītisko baktēriju darbībai labvēlīgu vidi.

7. Vidējas devas topinambūra miltu koncentrāta palielināja spurekļa *saccus ventralis et dorsalis* kārpiņu platumu un muskuļslāņa biezumu. Probiotikas *E. faecium* pievienošana topinambūra miltu koncentrātā (satur inulīnu) būtiski (vismaz  $p < 0.05$ ) palielināja spurekļa kārpiņu garumu un platumu, bet samazināja muskuļslāņa biezumu spurekļa *saccus ventralis et dorsalis*. Visas topinambūra miltu koncentrāta un jaunizveidotās sinbiotikas devas būtiski palielināja tievās zarnas (*jejunum*) bārkstiņu garumu un platumu, un loka zarnas kriptu dziļumu.

8. Topinambūra miltu koncentrāta (izņemot 12 g devu) un visu jaunizveidotās sinbiotikas devu 56 dienu ilga izbarošana būtiski ( $p < 0.01$ ) palielināja imūnglobulīna A ekspresiju resnās zarnas *colon* vidusdaļas audos teļiem 12. nedēļu vecumā, nodrošinot augstāku zarnu gļotādas imunitāti, salīdzinot ar kontroles grupas dzīvniekiem.

9. Augstākās topinambūra miltu koncentrāta devas (24 g/dnn) un jaunizveidotās sinbiotikas (12 un 24 g/dnn) ar 0.25 g *E. faecium* diennaktī devas izbarošana teļiem, iespējams, nodrošina ilgāku sāta sajūtu, par ko liecina būtiski ( $p < 0.01$ ) zemāks greļņa imūnreaktīvo šūnu skaits glumnieka *pars fundalis* daļā un augstāks iegūtais kautsvara mērījums. Sinbiotikas *E. faecium* ( $2 \times 10^9$  CFU/g) pievienošana topinambūra miltu koncentrātā šos rezultātus būtiski neuzlaboja.

## PRIEKŠLIKUMI

Kā optimālāko devu teļu produktivitātes un attīstības uzlabošanā, vadoties pēc mūsu pētījuma rezultātiem, varam ieteikt topinambūra miltu koncentrāta vidējo devu (12 g/dnn), kas satur prebiotiku inulīns – 6 g.

## ZINĀTNISKĀS PUBLIKĀCIJAS UN TĒZES

### Scopus un Web of Science datu bāzēs:

1. **Arne Astra**, Ilgaza Aija. “Prebiotic and synbiotic effect on rumen papilla length development and rumen pH in 12-week-old calves”, *Veterinary World*, 2021, 14 (11): 2883-2888. DOI: 10.14202/vetworld.2021.2883-2888
2. **Astra Arne**, Aija Ilgaza, Liga Astra Kalnina. “Ghrelin immunoreactive cell amounts in the abomasum in 4 – month - old calves by feeding different amounts of prebiotics and new synbiotics”, *Veterinary Medicine International*, 2021, ID 5542372. DOI:10.1155/2021/5542372
3. Ilgaza Aija, **Arne Astra**. “Comparative effect of different amount of inulin and synbiotic on growth performance and blood characteristics 12 weeks old calves”, *Agronomy Research*, 2021 (4), 19. doi.org/10.15159/ar.21.149
4. **Arne Astra**, Ilgaza Aija, “The effect of synbiotic inulin and *Enterococcus* bacteria on digestive health and weight gain in calves”, *Agronomy Research*, 2021 (1), 19. doi.org/10.15159/ar.21.008
5. Grinfelde, I., Ilgaza, A., Jonova, S., **Arne, A.**, Kovalenko, K. “Inulin impact on CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> balance in Holstein friesian crossbreed calves rumen”, *International Multidisciplinary Scientific GeoConference*, 2018, *Surveying, Geology and Mining, Ecology and Management*, 18 (4.2), 507-513.
6. **Astra Ārne**, Aija Ilgaža. “Different dose inulin feeding effect on calf digestion canal state and development”, *Research for Rural Development*, LLU, 2016 (1), 116-119.
7. **Astra Ārne**, Aija Ilgaža. “Jerusalem artichoke flour feeding effects on calf development in the first months of life”, *Research for Rural Development*, LLU, 2014. (1) 169.-175.



## INTRODUCTION

Until the 3<sup>rd</sup> - 4<sup>th</sup> week of life, the digestive tract of a calf is more like the digestive tract of a single-chambered stomach than a multi-chambered stomach or ruminant digestive tract (Diao, Zhang and Tu, 2017). The highest risk to health and life for calves is between 7 and 21 days of age, as colostral immunity has decreased during this period but acquired immunity has not yet developed. During this time, the weight ratio of the rumen to the omasum changes, the rumen increases, and the omasum decreases in proportion to the rumen (Chase, Hurley and Reber, 2008). As a result, the digestibility of roughage increases and the need for milk decreases. It is possible that feeding of various complementary foods - prebiotics, probiotics or synbiotics to calves during the transition period to ruminants would accelerate the morphological and functional development of the rumen, which would reduce the cost to farmers of feeding milk or milk replacer. There are many studies described in the literature on single-chamber gastric animals fed with probiotics, prebiotics or other complementary feeds, but there is a lack of comprehensive research on the feeding of this type of complementary feed and its effects on calf growth and health.

It is known that there are innumerable beneficial bacteria in the digestive tract and in the body as a whole, which play a vital role in the body's immunity and digestive process (Garcia-Mazcorro and Minamoto, 2013). A common pathology in calves in the first two postnatal months is diarrhea, one of the reasons of which is mentioned excessive multiplication of pathogenic microorganisms in the digestive tract. Nousiainen and co-authors (2004) have investigated that microorganisms in the digestive tract of young animals respond to different types of stress, especially when it is associated with changes in animal feed or the environment, that can cause diarrhea in calves. For the prevention of gastrointestinal disorders and the treatment of diseases, scientists are increasingly recommending the use of supplementary feeds - prebiotics or probiotics, in the same time looking for new combinations or synbiotics, which is a promising alternative to the use of antibiotics. This reduces the risk of developing antibiotic-resistant bacterial strains, which is a major problem in veterinary as well human medicine and the environment due to the presence of such strains in soil and water (Fey *et al.*, 2000; Sardar *et al.*, 2021).

Polysaccharide inulin belongs to fructan group and is one of the most studied prebiotics. The acquisition costs of it is low but product obtained is with high biological value (Samanta *et al.*, 2013). Mammals enzymes can't hydrolyze inulin, due to its  $\beta$  - (2, 1) bonds, but in digestive channel it is fermented by bacteria. It is researched that inulin type fructans may affect gut microbiot, metabolism and can reduce glycemia, in case of obesity in animals and humans (Neyrinck *et al.*, 2016). One of the plants most rich in inulin is a Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*), where inulin concentration naturally reaches

15-20%. Therefore this plant is used for the obtaining of this substance in the industrial way (Fleming, Groot and Wassink, 1979; Wei *et al.*, 2017).

*Enterococcus* genus bacteria are the most studied and suitable probiotics in animal husbandry because they are found in the digestive tract of healthy animals. *Enterococcus faecium* is a gram-positive bacteria belonging to the group of lactic acid bacteria (LAB), capable of fermenting lactose, arabinose and mannitol (Chaucheyras *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 2016).

The **aim** of the study: to determine the Jerusalem artichoke flour concentration (containing prebiotic inulin) and the new synbiotic (its combination with *Enterococcus faecium*) multiple dose impact on growth, development, overall health and gastrointestinal tract organ development in calves in first months of postnatal ontogenesis.

### **Objectives of the doctoral thesis**

1. Investigate different doses of Jerusalem artichoke flour concentrations or its synbiotics feeding for 56 days effect on weight, gastrointestinal tract masometric and morphometric indicators for 12-week-old calves;
2. Determine Jerusalem artichoke flour concentrate (contains prebiotic inulin) or new synbiotic (Jerusalem artichoke concentrate in combination with *E. faecium*) different dose impact on overall calf health including fecal matter consistency and hematological and biochemical indicators in 4 to 12-week-old calves;
3. Evaluate stomach, large and small intestine morphofunctional indicators and microscopic changes after addition of different dose of Jerusalem artichoke concentrate or its synbiotics to food for 56 days in 12-week-old calves;
4. Evaluate the effect of addition of Jerusalem artichoke flour concentrate or the new synbiotics effect to food for 56 days on immunoglobulin A expression in colon tissue in 12-week-old calves;
5. Evaluate ghrelin immunoreactive cell amount in the abomasum of 12-week-old calves after 56-day long addition of different dose prebiotics and synbiotics.

### **Proposed hypothesis**

1. Feeding Jerusalem artichoke flour concentrate and its synbiotics will promote the growth of calves and improve the masometric and morphometric development of the digestive tract, improving the general health of calves during the transition period to be ruminants;

2. Feeding Jerusalem artichoke flour concentrate and its synbiotics will promote the microscopic development of calves rumen, abomasum, small and large intestine, thus improving digestion and absorption of feed;
3. Calves received Jerusalem artichoke flour concentrate with the addition of probiotics *Enterococcus faecium* will have a higher live weight, better general health, better microscopic development of digestive tract, the rumen warts and small intestinal villi will be longer and wider than calves receiving only the same dose of Jerusalem artichoke meal concentrate;
4. Feeding higher doses of Jerusalem artichoke concentrate or its synbiotics to calves will give a better effect on: live weight, gastrointestinal massometric, macromorphometric measurements, general health indicators, micromorphometric indicators for calves.

### **Scientific novelty of the research**

For the first time in Latvia the effect of different doses of Jerusalem artichoke flour concentrate (containing 48.5 - 50.1% of the prebiotic inulin) and its combination with the probiotic *E. faecium* ( $2 \times 10^9$  CFU/g) on calf growth and general health, as well as the incidence of ghrelin IR cells in the abomasum was evaluated. mucosa and immunoglobulin A expression in the colon mucosa of calves in transition to ruminants. New data were obtained on the effect of different doses of Jerusalem artichoke flour concentrate (inulin 3 g, 6 g, 12 g/day on animal) and synbiotics (3 g, 6 g, 12 g of inulin with 0.25 g of *E. faecium* per day on animal) on the masometric, macro- and micromorphometric, development in 12-week-old calves.

### **Personal contribution to promotion work**

I have performed clinical evaluation and inspection of all calves involved in this study, performed live weigh measurements, obtained blood samples, performed all blood sample hematological analysis and obtained all blood serums, obtained, fixed and colored all histological samples, performed all masometric and morphometric measurements, performed visual observations, data entry and analysis of all samples as well as I am the author of all microphotographs included in this work.

### **APPROBATION OF THE RESEARCH RESULTS**

Research results are approbated in the following scientific conferences:

1. **Ārne A., Ilgaža A.** *The probiotic resource availability of calves in Latvia.* International Scientific Conference "Animals. Health. Food Quality". Current events in veterinary research and practice", Jelgava, November 22<sup>nd</sup> – 23<sup>rd</sup> 2012,

Latvia University of Agriculture faculty of Veterinary Medicine (Veterinary Articles 2012). Jelgava LLU: 175-178. Poster presentation.

2. **Ārne A.**, Ilgaža A. *Jerusalem artichoke flour feeding effects on calf development in the first months of life*. Research for rural development 2014: annual 20th international scientific conference proceedings, Jelgava, 21-23 May 2014 / Latvia University of Agriculture. Jelgava : LLU, 2014. Vol.1, 169-175. Oral presentation.

3. **Arne A.**, Ilgaza A. *Probiotic and prebiotic effects on calf development in the first months of life*. Book of abstracts of the 65th annual meeting of the European Federation for Animal Science, Copenhagen, Denmark, 25-29 August 2014 European Federation of Animal Science. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2014. P. 300, Session 37. Poster presentation.

4. **Ārne A.**, Ilgaža A. *Prebiotic and probiotic feeding effects on calf growth and digestive canal development in the first four months of life*. International Scientific Conference “Animals. Health. Food Quality” “Current events in veterinary research and practice”, Jelgava, November 27-28, 2014/ Latvia University of Agriculture faculty of Veterinary Medicine (Veterinary Articles 2014). Jelgava LLU: 9-17. Poster presentation.

5. Ilgaza A, **Ārne A**, Otzule L. *Possibilities to reduce the greenhouse gas calculated emissions by speeding up the calf and kid development*. Nordic view to sustainable rural development: proceedings of the 25th NJF Congress, Riga, Latvia, 16th-18th of June, 2015. Poster presentation

6. **Arne A**, Ilgaza A. *Different synbiotic dose feeding effect on the calf digestive channel health, weight gain and intestinal microflora*. VII International scientific agriculture symposium "AgroSym 2016": book of abstracts, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, October 6 - 9, 2016 / University of East Sarajevo, Faculty of Agriculture. Jahorina, 2016. Poster presentation.

7. **Ārne A**, Ilgaža A. *Different dose inulin feeding effect on calf digestion canal state and development*. Research for Rural Development 2016, Jelgava, 18-20 May 2016, Volume 1 , 116-119. Oral presentation.

8. Ilgaza A, **Arne A**. *Different synbiotic dose feeding effect on the calf digestive channel health and weight gain* 16th International conference on Production Diseases in Farm Animals: book of abstracts, Wageningen, the Netherlands, 20-23 June 2016/ Wageningen University & Research, Utrecht University. Wageningen, 2016. Poster presentation.

9. **Arne A**. *Different doses of inulin feeding influences calf growth and general health state* 5th International conference for young researchers “Multidirectional research in agriculture, forestry and technology”: abstracts book, Kraków, Poland, 16-17 April 2016. Poster presentation.

**Volume of the reaserch:** doctoral thesesi is drawn up on 118 pages and consist of an introduction, literature overview, materials and methods, results and

discussion, 11 tables, 35 figures are included in the work, 9 conclusions, 1 proposal, 349 citations and 5 annexes.

## MATERIALS AND METHODS

### Research time, object, its characteristics

The study was conducted between September 2012 and August 2016 in Mežotne Parish, Bauska Region, in the herd of dairy cows. The basic principles of feeding and keeping conditions of calves reared on the farm complied with the Regulations of the Cabinet of Ministers (CM) No. 5 of 2 January 2008 (Protocol No. 18) “General Welfare Requirements for Farm Animals”. The data required for the study were obtained in the frame of the routine calf keeping, feeding and veterinary care plan on the farm in accordance with the requirements of good veterinary practice and ethics.

Detection of calf live weight and collection of blood samples was performed on the farm, morphometric evaluation of calf organs was performed in a certified slaughterhouse “Aibi”, haematological examination and preparation of histological samples were performed at LLU VMF Morphofunctional Laboratory, Comparative Pathology Laboratory and LLU Veterinary Clinic Laboratory.

Until the start of the study, when the calves were 3 weeks old, they were provided with the same housing conditions. All calves received two liters of colostrum within 30 minutes of birth. Animals were selected at random. All calves were clinically evaluated before the experiment: heart rate, respiratory rate, rectal temperature, and *habitus*. Each group included male Holstein -type calves that were  $23 \pm 5$  days old. Only clinically healthy calves weighing  $50\text{kg} \pm 5$  kg were included in the study. A total of 56 male calves were included in the main study, which lasted 56 days. The calves were kept five in one  $7.5 \text{ m}^2$  pen. The pens were cleaned manually once a day. The barn was provided with natural ventilation. The dishes from which the animals were fed were washed after each meal and disinfected as needed with “Ecocid S” disinfectant.

All calves during the whole experiment were fed with 4 liters of whole milk twice a day, for a total of eight liters per day. The milk was calculated for each group of calves and poured into a common trough. For calves, hay and water were available *ad libitum* from the first day of the study, from the 14<sup>th</sup> day of the study, when calves reached five to six weeks of age, we added concentrates to the diet. Initially dry grain mix was used  $100 \text{ g/day}$  per animal, which gradually was increased and at the end of the study the feed ration was  $500 \text{ g/day}$  per calf. The dry grain mix was produced on the farm, was based on wheat grains and did not contain growth promoters or antibiotics.

Seven different study groups were set up, which differed in the feed additives and their doses (Fig. 1). The animals in the control group received only the daily ration without feed additives. Calves in each study group received a different type and dose of feed supplement together with whole milk. For the three groups of calves, which we designated as prebiotic groups (PreG6; PreG12; PreG24), we additionally fed prebiotic-containing Jerusalem artichoke flour concentrate (inulin  $50 \pm 2\%$ ) 6 g, 12 g or 24 g. The other three groups were called synbiotic groups because we added a new synbiotic product to the milk fed to those calves (SinG6; SinG12; SinG24): 0.25 g *E. faecium* ( $2 \times 10^9$  CFU/g) in combination with inulin-containing Jerusalem artichoke flour: 6 g, 12 g or 24 g.

During the study, we followed the general health status and weight gain of the animals. A farm worker assessed the calves' appetite and faecal consistency on a daily basis, which was noted in a specially designed table. To assess the consistency of faeces, we applied the scale of scores developed by Larson, where 0 - solid, no signs of diarrhea 1 - soft, 2 - liquid, faecal consistency lost and 3 - watery faeces (Larson *et al.*, 1977).

Once every two weeks, the animals were weighed by measuring their chest circumference behind the blades with a special tape measure "we-Bo tape" (Dingwell *et al.*, 2006). The first measurement was done at the start of the study (day zero) or four weeks of age, then on study day 14<sup>th</sup> (six weeks of age), study day 28<sup>th</sup> (at eight weeks of age), study day 42<sup>nd</sup> (at 10 weeks of age) and at the end of the study at 12 weeks of age - on the 56<sup>th</sup> day of the study.

After determining the body weight, blood samples were taken for blood haematological and biochemical examination, as well a general health status examination was performed: rectal temperature was measured, heart rate was heard, respiratory rate was counted and mucosal color was assessed.

It should be noted that no prophylactic vaccination or antibiotic therapy was performed in the animals during the study.

### **Haematological and biochemical examination of blood samples**

Blood samples were obtained from the external jugular vein *v. jugularis externa*: at the start of the study or study day zero, on study days 14<sup>th</sup> and 28<sup>th</sup>, always at 7:00 a.m. before feeding. At the end of the study or on the 56<sup>th</sup> day we obtained blood samples for haematological and biochemical examination before feeding the animals in the morning and before the transporting them to the slaughterhouse. Samples were obtained using a 20G needle, filling 3 ml EDTA vacuum tubes and 6 ml "Vakutest" vacuum tubes with coagulation activator.

The obtained blood samples were placed in a cold bag and delivered to the laboratory for examination within 4 hours after collection. The BC-2800Vet Hematology Analyzer was used for haematological analysis to detect Hematocrit (HCT %), hemoglobin (HGB g/dl), erythrocytes (RBC  $\times 10^{12}$ /L), leukocytes

(WBC  $\times 10^9/L$ ), lymphocytes (LYMF  $\times 10^9/L$ ), monocytes (MONO  $\times 10^9/L$ ) and platelet counts (PLT  $\times 10^9/L$ ). In the laboratory, blood serum was separated and placed in 2 ml Ependorf tubes and placed in a freezer at  $-23^\circ\text{C}$ . Biochemical blood samples were examined after 2 weeks. The following biochemical parameters were determined: gamma-glutamyl transferase (GGT U/L), alkaline phosphatase (ALP U/L), total protein (TP g/L) and albumin (ALB g/L). Glucose levels in calf blood samples were determined on the zero, 14<sup>th</sup>, 28<sup>th</sup>, and 56<sup>th</sup> day of the study immediately after blood sampling from the external jugular vein (*v. jugularis externa*) using a portable glucometer “Optium Freestyle” with the drip strip method.

### **Postmortem examination of the stomach and intestines**

At the end of the study, on the 56<sup>th</sup> day, all the calves of all groups were slaughtered according the study plan. Within half an hour, after the scheduled slaughter of the animal, small incisions were made at various sites in the digestive tract and, using the digital pH meter “pH 3310 SET”, we performed intraluminal determination of pH values: in the rumen *atrium rumini*; in the abomasum at the opening of the duodenum; in the middle of the jejunum; in the middle of the spiral loop of the colon.

Next, we performed a macroscopic evaluation of the animal's digestive tract, measuring and weighing individual organs; masometry (kg), determining the mass of the digestive tract with feed masses as well the mass of the rumen with and without feed masses and the mass of the abomasum with and without feed masses. Masses of the digestive tract were determined using a verified electronic platform scale CASO B5-LED (accuracy  $\pm 0.100$  g) of the slaughterhouse. We calculated the relative stomach mass (%) to the body mass of the calves. After slaughter, within 30 min the weight of the carcass was determined using large-scale DINUS ARGEO WP S/N 01186 (accuracy  $\pm 0.200$ g) verified scales of the slaughterhouse. The carcass was weigh without skin and head, thorax and abdominal cavity organs, kidney fat, pelvic fat, genital organs, legs were sepreated at the carpometacarpal and tarsometatarsal jonts.

Macroscopic examination of parts of the digestive tract was finalized with the morphometric measurements of the rumen and abomasum (cm). To do this, we opened the rumen by making a longitudinal cut along the left longitudinal groove of the rumen (*sulcus longitudinalis sinister*). The abomasums were opened by making an incision along the great circle of the stomach (*curvatura ventriculi major*). A ruler and tape measure were used to measure length and width. We determined the width and length of the rumen and abomasum.

Tissue samples for histological examination were obtained from different parts of the digestive tract: the dorsal sac of the rumen (*saccus dorsalis*), the ventral sac of the rumen, (*saccus ventralis*) from the abomasum: pars fundica, pars pylorica, from the middle part of the jejunum and the middle part of the

colon. Tissue samples (0.5-0.7 cm) after obtaining were washed with 0.9% NaCl solution and fixed in 100 ml dishes filled with 10% formalin solution, and labeled. The specimens were fixed for at least 48 hours, then the preparation of tissue histological preparations was started.

### **Histological examination of tissue samples**

Prestaining treatment and staining of tissue histological samples were performed in the Laboratory of Comparative Pathology of the VMF Preclinical Institute. *Tissue -Tek II* tissue processor and standard method was used for dehydration and preparation of samples for incorporation into paraffin blocks (Carson, 1997). After incorporating the samples into the paraffin blocks, the preparations were cut into 5  $\mu\text{m}$  thin sections and applied to a slide. The slide with a cut was placed in a thermostat at 38°C for 24 hours for drying and mounting on the slide.

For histological staining of tissue samples, we used the standard hematoxylin and eosin (H&E) staining method (Carson, 1997). The thermostat-dried tissue cuts on slides were deparaffinized with xylene, for a hydration of the samples, a series of decreases in alcohol concentration (100%, 96%, 70%, and 50%) were used.

After the staining of tissues was performed with hematoxylin for 10 min. and rinsing with tap water, then staining with eosin for three to five minutes. With the *Histofluid mounting medium* glue drop the tissue cut was fixed to the slide.

The obtained histological specimens were examined under a Leica DM 5000B light microscope using the computer program Image Pro Plus 6.1.

In rumen histological specimens, the papillae length, width, and muscle layer thickness were measured ( $\mu\text{m}$ ). Papillae length measurements were performed from the apical end of the papillae epithelium to the mucosal muscle plate (*lamina muscularis mucosae*), the papillae width was measured perpendicular to the length measurements in the middle part of the papillae. In each sample, 5 different fields of vision with the papillae were measured.

In the small intestine *jejunum* the villi length ( $\mu\text{m}$ ) was measured from the apical end of the villi epithelium to the mucosal muscle plate (*lamina muscularis mucosae*), the width of the villi or the intestine villi longitudinal cut diameter ( $\mu\text{m}$ ) was measured in the middle of the villi to the apical ends of the epithelial cells perpendicular to the length of the villi. Measurements were performed in each sample in 5 fields of view. In the colon crypt depth ( $\mu\text{m}$ ) was measured from the apical end of the crypt epithelium or the end of the crypt to the mucosal muscle plate (*lamina muscularis mucosae*) by examining 5 different fields of vision.



## Immunohistochemical examination

Immunoreactive (IR) cells were detected by immunohistochemical staining of tissues to detect ghrelin in the cuts of abomasum tissues, and in the cuts of colon tissue IgA expression. Immunoreactive cell labeling was performed with streptavidin - biotin complex (Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB +, Rabbit/Mouse). Tissue samples were applied to slides coated with silane (HistoBond®+, Paul Marienfeld GmbH &Co KG, Germany), thermostated for 12 hours at 37°C. Tissue samples were deparaffinized with xylene and performed hydration with ethanol reduction series. After samples were placed in 65°C buffer solution pH 9.0 (Target Retrieval solution, pH 9, Dako) and for the purpose to release epitopes to bind antigen to the antibody, were treated twice intermittently, to 70°C with a microwave 450 W for 5 min. After heating, the samples were cooled to room temperature and for the blockage of the endogenous peroxidase, the endogenous peroxidase blocking reagent (“Dako Endogenous enzyme block”) was applied for 5 minutes.

For the identification of IgA, as primary antibodies was used polyclonal concentrated rabbit antibodies (Polyclonal *Rabbit Anti- Human IgA*) at a dilution of 1:400, and for the identification of ghrelin - rat, mouse polyclonal antibodies (Phoenix Pharma. Inc.H - 031-31) at a dilution of 1:500. Tissue samples were incubated at room temperature for the detection of IgA for 1h and for detection of ghrelin - in a humid chamber for 3 h and then rinsed with phosphate buffer (*Wash Buffer*, pH 7.4, Dako 2×5 min).

To detect the binding of immunoreactive cells to the primary antibody, the antigen-antibody complex was labeled by applying a secondary antibody corresponding to the origin of the primary antibody for 30 min and stained by applying the DAB+ complex (Dako REAL™ EnVision™ Detection System) for 5 min. In contrast and to avoid artifacts, the tissues were stained with hematoxylin. A positive control was prepared for each batch of preparations: for ghrelin antibody - histological cuts of the pyloric part of the dog's stomach; for identification of IgA antibodies - human skin sample according to the manufacturer's protocol, where a positive reaction is always observed. In turn for a negative control, parallel cuts of the preparations in which the primary antibody was replaced with an antibody diluent were used. No immune reactions to ghrelin or IgA were observed in these samples.

For the evaluation of immunoglobulin (IgA), we used an RGB color evaluation model, which involves examining the sample in the red, green, and blue spectral channels. The number of dots of each color (*red*, *green*, *blue*) found in the sample, determines the intensity of that color, which can vary from 0 to 255. Objects of a similar color absorb waves of a similar color, so to have full evaluation of red-brown color of the IgA granules, the opposite color of the spectrum, or blue had to be used (Vrekoussis *et al.*, 2009).

Samples were examined under a 400× magnification in light microscope (Leica DM 500B) and processed using the computer program Image Pro Plus 6.1.

### **Statistical data processing**

Statistical analysis of the data was performed with SPSS statistical software and *Microsoft Excel 2013* data processing functions, calculating the arithmetic mean (AVERAGE), standard error of the mean (SD). To evaluate the difference in the obtained results, we used Student's t-test to compare the mean values of two samples and one- way analysis of variance (ANOVA) to compare three or more. The arithmetic means and standard error of each group of calves were calculated. Calculating the absolute masa of the stomach against the body masa, we obtained the relative weight of the stomach. We used a T-test to compare the mean values of interdependent sample sets. To compare and evaluate the changes in blood parameters between the experimental groups of calves, we used the F-test to compare the variances of two sample groups and the T-test to compare the mean of two sample groups with the same or different variances (Arhipova and Bălița, 2003). If the p - value obtained in the statistical test results was less than 0.05, the null hypothesis was rejected and the test result was considered statistically significant. The normal distribution of the obtained data was evaluated by Shapiro - Wilk test (histogram and QQ diagram). The homogeneity of the variances was assessed by the Levene test. Correlation analysis was performed in the work. samples.

## **RESEARCH RESULTS AND DISCUSSION**

### **Calf live weight gain and carcass weight after feeding different doses of Jerusalem artichoke flour concentrate and its synbiotics at different ages**

The results of our study show that, compared to calves in the control group, the largest and fastest weight gain is in calves fed with different doses of Jerusalem artichoke flour concentrate and its synbiotics. From the beginning of the study, weight gain in the first two weeks was significantly greater in animals fed Jerusalem artichoke flour concentrate or its synbiotics. This tendency was maintained throughout the study. A steadily higher increase in live weight was also indicated by a higher average daily increase in live weight throughout the study in the Jerusalem artichoke flour concentrate or its synbiotic fed groups compared to the calves in the control group (Table 1).

In the study as a whole, the largest increase in live weight was observed in the PreG12 group ( $102.3 \pm 3.86$  kg $\pm$ SD), which received a mean (12g) dose of Jerusalem artichoke flour concentrate (6 g inulin) daily during the 56 - day study.

Although we predicted that increasing the dose of this feed additive to 12g of inulin per day would result in even better results (higher daily live weight gain), the results did not confirm this (PreG24 group  $100.0 \pm 3.86$  kg $\pm$ SD).

A daily dose of 6g of inulin (g/d) was found to be most effective in achieving greater weight gain, whereas inulin at a dose of 3 g/d and 12 g/d produced relatively worse results. Also a study by Jonova and co-authors (2018) showed that, 12g of this Jerusalem artichoke flour concentrate (inulin dose 6 g/dn) resulted in significantly increased live weight of calves compared to control animals. Our data are consistent with those of other researchers showing that feeding prebiotics can significantly increase live weight gain in calves (Masanetz *et al.*, 2010; Khare *et al.*, 2018; Tian *et al.*, 2019; Swedzinski *et al.*, 2019).

In our study, we found that all three newly formed synbiotics (Jerusalem artichoke concentrate with inulin (50%) in combination with *E. faecium*) had a higher mean weight gain in the group compared to the control group. The largest increase in live weight was observed in the medium-dose synbiotic (SinG12) group. For this group, the most stable increase in live weight was observed throughout the study. Although SinG6 showed the lowest live weight gain ( $100.0 \pm 2.26$  kg $\pm$ SD) between synbiotic groups, however, it was also significantly ( $p < 0.01$ ) higher than in the control group ( $82.2 \pm 6.54$  kg $\pm$ SD). Similarly such effect is described by other authors (Dabiri, 2012; Moarrab *et al.*, 2016; Dar *et al.*, 2019; Sahu *et al.*, 2019).

Analyzing the carcass weight at the slaughter, we can conclude that in our study the animals of all three groups receiving Jerusalem artichoke flour concentrate it was significantly higher than for the control group, which shows that the animals fed the prebiotic inulin better assimilated the ingested feed. Many studies have shown that calves fed prebiotics have a higher dry matter intake compared to control animals (Morrison, 2010; Ballou, 2011; Roodposhti and Dabiri, 2012; Ghosh and Mehla, 2012; Liu *et al.*, 2020).

As in our study, Grun and co-authors (2013) achieved a higher carcass weight gain by feeding prebiotics to calves. The authors explain the higher live weight gain and higher carcass weight at the slaughter by the fact that calves fed prebiotics have better food intake and digestion.

### **The influence of different doses of Jerusalem artichoke concentrate and synbiotic feeding on morphometric and masometric measurements of calf rumen and abomasum in 12-week-old calves**

In order to determine the effect of the use of feed additives on the morphological development of calves, we performed morphometric and masometric measurements of the rumen and abomasum at the end of the study.

The empty rumen mass of all groups of animals receiving Jerusalem artichoke flour concentrate is higher (mean  $1.26 \pm 0.13$  kg $\pm$ SD) compared to KoG

( $1.00 \pm 0.14$  kg $\pm$ SD), which is in agreement with the data of other studies, where by feeding additives, the rumen mass increased (Górka *et al.*, 2011).

Stronger development of *saccus ventralis* muscle layer was observed for PreG12 ( $427.2 \pm 136.89$   $\mu\text{m} \pm \text{SD}$ ) and SinG24 ( $516.4 \pm 110.43$   $\mu\text{m} \pm \text{SD}$ ) groups, mean measurements were significantly higher than in KoG ( $383.6 \pm 142.11$   $\mu\text{m} \pm \text{SD}$ ).

We found that papillae of the rumen *saccus ventralis* used in digestive and absorption processes are significantly longer in the groups fed a higher dose of Jerusalem artichoke flour concentrate (PreG24  $937.8 \pm 479.69$  and SinG24  $1067.0 \pm 570.93$   $\mu\text{m} \pm \text{SD}$ ) than in the control group (KoG  $831.6 \pm 485.77$   $\mu\text{m} \pm \text{SD}$ ). It is possible that Jerusalem artichoke flour concentrate, which contains the prebiotic inulin, promoted the development of rumen tissue by providing it with the necessary nutrients and energy. However, this statement is not unequivocal as the measurements of the full rumen mass are similar for all groups and no significant differences were found in these measurements.

Our study shows that 12-week-old calves receiving Jerusalem artichoke flour concentrate with the prebiotic inulin also had a higher mass of abomasum compared to control animals. The lowest abomasal mass is in the control group, whose calves received the lowest dose of Jerusalem artichoke flour concentrate (PreG6) and calves of the all three newly formed synbiotic groups (Table 2). Accordingly, calves of these study groups have relatively higher stomach mass to carcass weight. In the groups of calves that received medium and higher doses of Jerusalem artichoke flour concentrate, the mass of the abomasum on average is 100 g heavier (mean in the group  $660 \pm 0.06$  g $\pm$ SD). However, we can only talk about the trend, because this difference did not turn out to be statistically significant.

Although Beharkka and co-authors (1998) note that the mass of the abomasum is not affected by the intake of roughage, other authors suggest that in animals that received the prebiotic inulin (in our case Jerusalem artichoke flour concentrate) together with a milk, develop a denser casein clot in the abomasum, what takes longer time to process (Mirand *et al.*, 2019). This may also explain the higher mass of full abomasum in calf groups which received Jerusalem artichoke meal concentrate (PreG6, PreG12, PreG24), because Mirand's (2019) study showed that casein coagulate formed from the casein clot remains in the stomach until gastric emptying is complete.

A similar tendency was observed in calves of the newly established synbiotic groups. In the medium and high dose synbiotic groups, the empty abomasum mass is numerically (but not significantly) higher than in KoG, but in the calves groups, which received the lowest doses of synbiotic, the difference it is lower SinG6 (Table 3). This was probably due to the presence of the probiotic *Enterococcus faecium* in the feed additive (Jerusalem artichoke flour concentrate), as this probiotic started to use inulin already in the rumen for its

own needs, so that inulin enters the abomasum to a lesser extent and is not able to form as dense casein clot as in case if the prebiotic is not used.

In our study, calves that received high and medium doses of Jerusalem artichoke flour concentrate and its combination with probiotics *E. faecium*, formed higher body weight, higher total gastrointestinal mass, and in these animals, the rumen papillae were longer as well the rumen muscle layer was thicker than in KoG .

### **The influence of different doses of Jerusalem artichoke concentrate and synbiotic feeding on rumen size and muscle layer thickness in 12-week-old calves**

Measurements of the length and width of the rumen papillae are used to determine the relative development of the rumen (Lesmeister *et al.*, 2004). In our study, the longest papillae of the rumen *saccus ventralis* were observed in PreG24 group animals ( $937.8 \pm 479.69 \mu\text{m} \pm \text{SD}$ ), the smallest - in PreG6 group of calves ( $818.3 \pm 485.05 \mu\text{m} \pm \text{SD}$ ), PreG12, SinG6, SinG12 and SinG24 group papillae were longer than in KoG ( $831.4 \pm 300.99 \mu\text{m} \pm \text{SD}$ ).

One of the possible reasons for this is that prebiotics promote the formation of volatile fatty acids, as the end product of the digestion of prebiotics is volatile fatty acids (Kaufhold *et al.*, 2000), which further influence the activity of digestive enzymes in the intestine. Volatile fatty acid butyrate is used by enterocytes a source of energy, supporting cell proliferation, differentiation and improves the buffer function of the intestines, what leads to development of the longer intestine villi (Long *et al.*, 2000; Samanta *et al.*, 2013; Ghosh and Mehla, 2012). By feeding prebiotics, the length of the intestinal villi is increasing, so improving the absorption capacity of intestinal tract and the absorption of nutrients in the intestine due to the increased absorption area of the intestinal mucosa. From our study it becomes clear that the groups of animals fed prebiotics in medium and higher doses, had higher weight gain and longer jejunum intestinal villi, as well as rumen *saccus ventralis et dorsalis* papillae.

We found that those calves which together with milk received the average dose of Jerusalem artichoke flour concentrate (PreG12) had the longest jejunum villi ( $594.3 \pm 151.42 \mu\text{m} \pm \text{SD}$ ), but the shortest villi were in KoG ( $465.7 \pm 127.29 \mu\text{m} \pm \text{SD}$ ). Costa and co-authors (2019) explain the development of longer villi in the gut by the fact, that animals have better access to energy, what allow rumen and intestinal tissue to develop and regenerate better. Also, our study shows that feeding prebiotics (inulin in our case) together with milk promotes faster growth, better development and adaptation of calves in the transition to roughage. Our study also proves that feeding a prebiotic inulin to calves during the transition from dairy to roughage feed can help the calves to adapt to the new feeding stuffs.

## **Influence of feeding of different doses of Jerusalem artichoke concentrate and its synbiotic on the pH of various parts of the digestive tract in 12-week-old calves**

As it is known in the rumen, there are more than 150 different species of microorganisms which break down carbohydrates, proteins and fiber. Fiber-digesting bacteria work most effectively at pH 6.2-6.8, but for starch digesting bacteria it is more suitable at pH 5.2-6.0. To reach normal digestive processes of complex feed Good feeding practice guidelines state that the optimal rumen pH should be between 5.8-6.4 (Highfill and Lalman, 2005).

Prebiotics play an important role in the absorption and transport of various minerals; increase the production of volatile fatty acids, e.g. the formation of butyrates; the breakdown of minerals; thus providing an energy source for intestinal epithelial cells and improving absorption capacity (Singh *et al.*, 2017).

In studies with the use of prebiotic - the polysaccharide beta glucan, was noticed an increase in the pH of the rumen environment and better digestion of nutrients (Kim *et al.*, 2011).

In our study, KoG animals had the most acidic rumen medium, but less acidic (pH  $6.45 \pm 0.38$ ) in the PreG12 group. The results show that the pH of the calves that received the lowest dose of Jerusalem artichoke flour concentrate containing 3g of the prebiotic inulin was similar to that observed in the control group pH level (pH  $5.7 \pm 0.60$ ). We can conclude that such a dose of prebiotic inulin (3g/d) does not provide the optimal pH level of the rumen content described in the literature. Animals fed a half bigger dose of prebiotic inulin (6g/d) had significantly ( $p < 0.05$ ) higher rumen pH level (mean pH  $6.1 \pm 0.39$ ) than the 3g/d inulin group. When studying ruminants, it is important to take into account the changes in rumen pH, as the primary digestion and fermentation is performed in rumen what significantly influence the health and digestive processes of adult ruminants. This pH level provides the optimal environment for fiber and starch cleavage, mentioned in the literature (Highfill and Lalman, 2005). For the groups whose animals received the newly formed milk synbiotics, we found that the pH in the calf rumen was on average  $6.01 \pm 0.45$ , which was slightly higher than in the control group. In our study, where synbiotic contain inulin and *Enterococcus faecium* the pH level in the rumen tends to be closer to a neutral pH level.

Although we observed significant differences in the pH levels of the abomasal environment in groups SinG and KoG, they cannot be considered physiologically significant, because the pH of the abomasal environment fluctuated from 3.50 to 3.68, which is the characteristic acid/alkali balance in the abomasum. The pH of the small intestine content ranged from 7.67 to 7.94 units. Similarly, fluctuations in colon content from 7.02 to 7.5 pH units is indicating more a weakly alkaline reaction, which is characteristic for the colon environment.

## **Microscopic measurements of the jejunum of calves at 12 weeks of age**

Measuring the small intestine jejunum villi, we found that they are significantly longer Jerusalem artichoke flour concentrate and newly formed groups of calves receiving synbiotics than the control group. Longer and wider villi in the small intestine increase the absorption of nutrients and promote the growth and development of calves, as shown by other measurements. Caspary (1992) describes that the longer the intestinal villi, the larger the surface area of the intestine and the better the absorption of nutrients. Similarly are thinking Xu and co-authors (2003) who describe that animals with shorter intestinal villi have decreased intestinal absorption functions and increased secretory functions resulting in slower animal development. In our study, calves that received feed supplements had significantly higher live weight gain and jejunum villi length (Table 3). It is possible that these longer villi (compared to KoG) increased the area of absorption in the intestine. Improving intestinal morphological development not only improves the absorption and digestion of food, but also the ability of animals to protect themselves against infections caused by pathogenic bacteria (Dimitroglou *et al.*, 2009).

## **Influence of the Jerusalem artichoke concentrate and its synbiotic feeding on the depth of the colonic crypt in the mucosa of calves at 12 weeks of age**

Performing a colon crypt depth measurements showed that calves of experimental groups, which were approximately 84 days old and had received Jerusalem artichoke concentrate and its synbiotic, had significantly shallower colon crypts than in KoG calves ( $592.5 \pm 145.5 \mu\text{m} \pm \text{SD}$ ). When evaluating the crypt depths in the colon, we found that the crypts were shallower than the KoG in both PreG and SinG groups (Table4). The deepest colon crypts from PreG group calves were PreG6 ( $532.5 \pm 86.39 \mu\text{m} \pm \text{SD}$ ), but from SinG calf groups - SinG6 group ( $534.9 \pm 126.62 \mu\text{m} \pm \text{SD}$ ). This is similar to the results described by Fleige and co-authors (2007) who fed lactulose with *E. faecium* to calves .

As we known, apoptosis is important for the digestive tract because it is responsible for the balance of cell regeneration, ensuring both cell proliferation and cell death, and is an essential process for normal cell morphology and function ( Hall *et al.*, 1994). It is proved that prebiotics increase intestinal apoptosis to protect against carcinogenic cells (Hughes and Rowland, 2001). Klien and co-authors (2006) also emphasize that prebiotics enhance apoptosis and reduce proliferation.

Various feed additives, including prebiotics and probiotics, improve the intestinal absorption of nutrients, as evidenced by the more species-specific consistency of faecal masses and the lower incidence of diarrhea (Xiao *et al.*, 2016). In our study, the intestinal villi are longer in the groups that

received different doses of PreG and SinG , and the consistency of the faecal mass of these groups is more species-specific more formatted compared to the control group.

### **The changes of faecal consistence in calves at different ages**

Examining the consistency of the faecal masses, we found that during the study, the groups of calves fed inulin at higher doses (12 and 24 g/d) had more formatted and species-specific faecal mass. No significant differences in faecal mass consistency were observed between the groups of animals treated with prebiotics, similar to studies performed by other authors on the feeding of prebiotics to calves (Heinrichs *et al.*, 2003; Quezada-Mendoza *et al.*, 2011; Hasunuma *et al.*, 2011; Kara *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2018; Senevirathne *et al.*, 2019).

Faecal mass dilution was observed in both - the groups where calves were feed with the Jerusalem artichoke meal concentrate and in the control group during the second weeks of study, what could be induced by the addition of the new concentrate feed to the diet of calves (Fig. 2). Another reason for the change in the consistency of faeces at this age could be reduced level the antibodies (IgG ) obtained with colostrum, as those antibodies had so far protected the calves from various adverse external conditions and pathogens.

At the beginning of the study and the beginning of the concentrate feeding period, the consistency of the faeces was more fluid than in the second part of the study (Fig. 2), as their digestive system had to adapt to the new nutrients. The results show that the Jerusalem artichoke flour concentrate with its inulin added to the milk helps to overcome the change of diet and the calves adapt faster to the new nutrients. Bacteria existing in the colon can easily use prebiotics in a variety of fermentation processes that promote the growth and development of those bacteria, thus providing protection against pathogenic bacteria (Ohland and MacNaughton, 2010; Roodposhti *et al.*, 2012). The faster return of faecal mass to the species-specific consistency shows that the feeding of all three dose- levels of prebiotics used in our study ensures better functioning of the intestinal tract even in the case of feed changes (Fig. 2). In our study, in the synbiotic group of animals (as in the groups of calves receiving Jerusalem artichoke flour concentrate alone), we observed the dilution of faecal masses at the time when we added a new product (rough-hewn concentrates) to the established diet. As a result, harder, species-specific faecal masses were observed in calves fed three different doses of synbiotics than in control animals. Thus, for SinG groups, changes in diet also reduced the dilution of faecal masses, which usually results from dietary changes. Calves of the SinG12 group receiving 12 g of Jerusalem artichoke flour concentrate (containing 6g inulin) showed the most stable faecal consistency throughout the study.



It should be noted that the addition of probiotic *E. faecium* to Jerusalem artichoke flour concentrate, which contains ~ 50% of the prebiotic inulin, thus creating a synbiotic, in our study improved the consistency of faecal mass also during the feed change. Feeding all three dose-levels of this synbiotic improved the consistency of the faecal masses - they were slightly harder and more species-specific than in the prebiotic and control groups. This could be explained by the fact that the prebiotics and probiotics contained in the synbiotic act synergistically and promote the activity of intestinal microorganisms favorable for digestive processes, thus the consistency of faecal masses characteristic to the species (Fig. 2).

In calves, we evaluated not only the consistency of faecal masses, but also other general health parameters such as rectal temperature, heart rate, and respiration rate per minute. It should be noted that all of these parameters were within the normal range throughout the study and no significant differences were observed between them.

### **Changes of haematological parameters in 4-12 week old calves after feeding different doses of Jerusalem artichoke concentrate and its synbiotics**

The age of calves is increasing during the studies, and as Klinkon and Ježek (2007) write, so determinants of blood haematological and biochemical values are also changing at different stages of the animal's age and development. In calves, blood determinants is particularly affected at a time when dry food (hay, concentrate) is being fed after milk feeding (Klinkon and Ježek, 2007).

In calves, the number of erythrocytes increases with age, however, in the groups of calves receiving medium and high doses of Jerusalem artichoke flour concentrate (inulin 6 and 12 g) it increased faster (Fig. 3). Throughout the study, animals fed different doses of Jerusalem artichoke flour concentrate had higher levels of erythrocytes and haemoglobin than KoG calves. As known, the main function of erythrocytes is the transport of gas, supplying oxygen to the cells and removing carbon dioxide. The sufficient hemoglobin levels in erythrocytes makes sure this function is realised (Awodi *et al.*, 2005).

In our study, the most significant differences appeared on the study day 28, when calves fed Jerusalem artichoke flour concentrate had higher hemoglobin concentrations (Fig. 5). Scholz-Ahrens and co-authors (2015) in a study with rats using the prebiotic inulin demonstrated that inulin is able to increase the bivalent metal transporter 1 (DMT1) in the colon, which is a protein responsible for the transport of iron ions in humans and animals. It is possible that the animals in our study had better absorption of iron ions than control calves to which no inulin had been added. It is known that the prebiotics inulin and oligofructose may have a positive effect on the proteins that regulate the absorption of iron ions in humans and animals (Marciano *et al.*, 2015).

Calves receiving Jerusalem artichoke flour concentrate (inulin doses 6 and 12 g/d) had higher hematocrit (Fig. 4) and hemoglobin levels (Fig. 5), which may indicate better iron absorption. Control calves on 28 and 56 study day had below normal hematocrit, indicating lower iron absorption.

In control animals relatively lower hemoglobin levels were observed on the day 28 of the study, when calves were at seven weeks of age. This coincides with the research results of other authors. In their studies, also the lowest hemoglobin levels were showed in calves at this age, after hemoglobin levels tended to increase again (Mohri *et al.*, 2007; Dar *et al.*, 2017).

Masanetz and colleagues (2011) not only found significant differences in the total erythrocyte count between the prebiotic group and the control group, but also observed a significant difference in hemoglobin levels in calves fed inulin. It was significantly higher than in the control group and in lactulose -treated groups. This is consistent with the data from our study, where we found that feeding medium and high doses of Jerusalem artichoke flour concentrate containing inulin 6 or 12 g significantly increases hemoglobin levels. It should be noted that Klinkon and Ježek (2007) describe that the amount of erythrocytes in the blood of calves increases when they start consuming roughage, which is observed also in our study in groups PreG12 and PreG24 and all SinG groups, but not in KoG .

In our study in the synbiotic (SinG12 and SinG24) groups hemoglobin and hematocrit levels were higher than KoG, and in the SinG12 group hemoglobin ( $p < 0.01$ ) was higher already from the day 28 of the study. Roland and co-authors (2014) described that in calves hemoglobin and hematocrit levels decrease in the first months of life and increase again from the third month of life, which was also observed in our study for all calf groups to which we fed feed supplements. However, it should be noted that Azimzadeh and co-authors (2016) did not find significant differences in the number of erythrocytes and hemoglobin in the blood between the synbiotic and control animals. It has been proved that also synbiotics can help to absorb various minerals, including iron (Ahmad *et al.*, 2021), this could be the reason for higher hemoglobin levels in calves receiving synbiotics .

Increased level of leukocytes may indicate the development of infection, and stress may increase their levels as well (Fig. 6). It is proved that prebiotics can stimulate the immune system (Seifert and Waltz, 2007), which affects the amount of white blood cells in the blood. In our study, animals in all groups on day the 56<sup>th</sup> day of study had more leucocytes in blood than on the day 0.

In calve groups receiving higher dose of Jerusalem artichoke flour concentrate and its combination with probiotics (PreG24 and SinG24) throughout the study, we haven't observe sharp changes in leukocyte counts, but in the control group and in the lower prebiotic (PreG6) group they were more pronounced at the end of the study (Fig. 6). Although on different days of the

study statistically significant differences in changes of leukocyte averages were observed between the control and study groups, none of the calf groups were outside the reference range. It cannot be said that feeding of Jerusalem artichoke flour concentrate would affect the number of white blood cells. Król (2011) describes an increase in white blood cell counts due to an inflammatory response in the intestines to a high dose of prebiotic. El-Mehanna and co-authors (2017) also found in their study that the total leukocyte count in the prebiotic and synbiotic groups was higher than in the control group, which would confirm this theory.

In our study, higher lymphocyte counts were observed in groups of calves treated with Jerusalem artichoke meal concentrate throughout the study compared to animals in the KoG group. This is probably because prebiotics may be able to affect the immunity of the intestinal mucosa and keep the body healthy. Dar and co-authors (2017) described that the number of lymphocytes in the prebiotic and synbiotic group was significantly higher than in the control group, which was explained by an increase of immunity and development of immune response. In our study synbiotic groups had higher lymphocyte counts up to the day 56<sup>th</sup>, but at the end of the study (day 56 ) calves of KoG had slightly more lymphocytes than SinG6, but less than the SinG12 and SinG24 groups (Fig. 7). In the the study as a whole we found higher lymphocyte counts synbiotics groups, and possibly stronger immunity.

Regarding the number of monocytes in the blood, it should be noted that throughout the study, in all groups the number of monocytes was close or above the upper reference range. It should be noted that the number of monocytes in prebiotic groups was lower than that in the control group. A relatively lower number of monocytes was observed in the group receiving the highest Jerusalem artichoke concentrate for calves (PreG24 group). Although the mean values of the number of monocytes between the groups showed a statistically significant difference in particular cases, it has no physiological significance, as the fluctuation of their number was between  $0.8$  and  $1.1 \times 10^9/L$ , which cannot be considered physiologically significant.

Platelet counts were higher in calves treated with Jerusalem artichoke meal concentrate and its synbiotic throughout the study compared to control animals (Fig. 8). It has been found that platelet counts in calves are rapidly increasing in the first two weeks of life, and then the increase in the next three months is not so fast (Roland *et al.*, 2014). During study days from 0 to 28<sup>th</sup> comperably higher platelet counts (PLT  $\times 10^9/L$ ) were observed in KoG animals. On the days 14<sup>th</sup> and 28<sup>th</sup> of the study, the mean platelet count was significantly ( $p < 0.01$ ) lower in all calves of groups treated with Jerusalem artichoke meal concentrate than in the control group. Newly created synbiotic groups also showed significantly ( $p < 0.01$ ) lower mean compare to KoG platelet counts during this period. For SinG calf groups, we observed a higher number of PLTs than PreG.

At the end of the study (day 56), we found that the mean platelet count in all groups of calves had decreased. No significant differences were found between calves of the different dose of groups supplements and KoG.

### **Changes in blood biochemistry in 4 - 12 week old calves after feeding different doses of Jerusalem artichoke flour concentrate and its synbiotics**

Determination of total protein (TP) levels is very important in the diagnostics of many diseases and disorders. In ruminants, not only age but also diet and inflammatory processes can affect total protein levels in blood plasma (Kaneko, 1997; Kraft and Dürr, 1999c; Shil *et al.*, 2012). During postnatal development, it is the age of the calves that is mentioned as the main factor influencing the total protein level in the blood plasma, emphasizing that it is lower in calves than in cows (Kaneko *et al.*, 1997; Shil *et al.*, 2012).

Calves in all of our study groups have a tendency to increase levels of total protein as they age. Comparing the TP level at beginning of the study, ie in 21 days old calves, and at the end of the study, ie after 56 days, the TP plasma levels of all calves receiving the supplement were higher than in the control animals. An exception was study day 28<sup>th</sup>, when TP levels were lower in all groups than in study day 14. This can be explained by the dilution of faecal masses from the day 14<sup>th</sup> to the day 28<sup>th</sup> of the study.

In our study, calves in the PreG24 group that received the highest dose of Jerusalem artichoke flour concentrate (inulin 12 g/d) had significantly higher TP levels ( $p < 0.01$ ) than control animals. At the end of the study, the total amount of protein in the plasma of PreG12, SinG6 and SinG12 groups was significantly ( $p < 0.01$ ) higher than KoG, which could indicate better possible absorption of protein in the gastrointestinal tract.

Lower plasma albumin levels in healthy animals could be a consequence of insufficient amino acid supply (Whitaker, 1997). In our study, in all study groups, the lowest level of albumin was on the day 28<sup>th</sup> of the study, or 42 days old calves, which happened at the same time as faecal mass dilution. This could be one of the main causes of albumin reduction during this period. Klinkon and Ježek (2007) also describe that albumin level reduction below normal or hypoalbuminemia in calves occurs in case of diarrhea. It should be noted that throughout our study for all study groups of calves, the mean plasma albumin levels were above the normal range. This can be explained by the fact that the calves received whole milk throughout the study, which could provide higher plasma albumin levels. Hyperalbuminaemia can be observed in cases of dehydration, but in our study calves hematocrit was within normal limits throughout the study, so this possibility is ruled out.

Alkaline phosphatase (SAP) activity is increased during acute and chronic liver diseases, as well as during diseases affecting the skeletal system and bones (rachitis, periostitis). It is known that the activity of the enzyme decreases as the

animals age, due to the fact that growth is less rapid and the level of SAP decreases (Kaneko, 1997). Knowles and co-authors (2000) describe that in calves, at the age of 60 days, the level of SAP in the blood decreases and its activity becomes more stable (until then, the enzyme concentration in the blood plasma is higher). Similar dynamics were observed also in our study for PreG6 and all SinG groups, as well as for control calves. In calves of the PreG12 group, SAP level decreased during the study period.

In our study, in all groups of animals the mean gamma-glutamyl transferase (GGT) level in a group was within the normal range, although GGT levels were higher at beginning of the study and decreased with age of calves. This dynamic corresponds to age-related changes.

Glucose levels in the PreG12 group on days 14<sup>th</sup>, 28<sup>th</sup>, and 56<sup>th</sup> of our study were significantly ( $p < 0.01$ ) lower compared to KoG animals. Throughout the study SinG24 group glucose levels were significantly ( $p < 0.05$ ) lower than KoG. Glucosis level was lower also to compare to calves that additional to milk received Jerusalem artichoke flour concentrate powder (inulin 3 g/d and 6 g/d) or the same dose in combination with *E. faecium*. Glucose levels in calves are known to be higher than in cows, which is explained by the fact that calf stomachs initially function similarly to monogastric animals (Doornenbal *et al.*, 1988; Shil *et al.*, 2012).

### **Influence of the feeding of Jerusalem artichoke concentrate and its synbiotic on the expression of immunoglobulinA in the intestinal mucosa of colon of calves at 12 weeks of age**

The main function of immunoglobulin A (IgA) in the intestines is to prevent the attachment of pathogens to the intestinal wall, ensuring cellular immunity and homeostasis, as IgA is released through the surface of the intestinal mucosa (Suzuki and Nakajima, 2014). IgA is the first what protects the intestinal epithelium from enterotoxins and pathogenic microorganisms, activating the colonization of beneficial microorganisms.

In our study expression of IgA in the immunoreactive cells of the mucosa of colon is significantly ( $p < 0.01$ ) higher for all groups of calves receiving Jerusalem artichoke flour concentrate and its synbiotics than in control animals (Table 5). Feeding of the feed additives included in our study is likely to improve colonic microbiota, thereby improving intestinal wall immunoreactivity and resistance to pathogenic microorganisms, as evidenced by higher IgA expression in intestinal tissues due to IgA secretion a response to bacterial colonization (Cebra, 1999).

In our study, the lowest expression of IgA in the colon tissues was observed in KoG compared to groups of animals fed Jerusalem artichoke flour concentrate and synbiotic. Medium dose Jerusalem artichoke flour concentrate (containing 6 g of inulin) or PreG12 in combination with *E. faecium* gave the best results, due

to the possibility that beneficial bacteria in colon were able to use inulin for their growth and promote local intestinal immunity.

### **Number and location of immunoreactive cells containing ghrelin in the abomasum of 12-week-old calves fed 56 days with Jerusalem artichoke flour concentrate and its synbiotic**

One of the aims of the study was to evaluate Jerusalem artichoke flour concentrate or its combination with *E. faecium* effects on hunger and satiety. Ghrelin immunoreactive cells were detected both in the control group and in groups fed by different doses of Jerusalem artichoke flour concentrate and its synbiotics in the abomasum of 12-week-old calves. This complements the studies described by other authors that ghrelin IR cells have been detected in calves as early as two weeks of age and in the abomasum of adult cows five years of age and older (Hayashida *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 2020). In addition, the amount of those cells in the two largest parts of abomasum - the fundus and pars pylorica differs significantly (Table 6). In our study, the number immunoreactive cells containing ghrelin in the abomasum *fundus* is significantly larger than in *pars pylorica* for all calves in the control group and animals in the study group, regardless of the type and amount of feed additives added to the milk. Other authors in their studies also describe that abomasum *fundus* part contains much more ghrelin - containing cells than *pars pylorica* (Strader and Wood, 2005; Kojima, Kangawa, 2005).

Ghrelin is formed in the epithelial cells of several parts of the digestive tract of animals - in the stomach, in the abomasum in ruminants, in intestines - caecum and colon (Date, 2012). Therefore, to evaluate the effect of different doses of Jerusalem artichoke flour concentrate containing prebiotics - inulin or synbiotics (Jerusalem artichoke flour concentrate in combination with *Enterococcus faecium*) on the development of hunger in calves, in our study we focused on the changes in the number of immunoreactive cells, containing ghrelin in mucosa of abomasum. This makes it possible to understand and indirectly assess the possible effects of different doses of these additives on food digestion, as when abomasum is emptied, ghrelin starts to be produced in the mucous membrane and then enters the peripheral bloodstream from. The number of ghrelin IR cells may be one of the indicators of growth, as it affects the level of somatotropin and also participates in the regulation of hunger and satiety (Feldman, 2021). As all animals received the same diet, a factor that could affect the duration of satiety after a meal is the digestion (digestibility) of food in the digestive tract - the higher it is, the longer the satiety is maintained after the same dose of feed. Higher nutrient intake should also have an impact on animal growth and, ultimately, on carcass weight.

Our study currently provides unique data on inulin (prebiotics) and its combination with 0.25 g *Enterococcus faecium* – synbiotics feeding to calves

influence on the amount of ghrelin IR cells in the mucosa of fundus and pylorus parts of abomasum, as well the location amount of ghrelin granules in the cells. In calves which received lower doses of prebiotics, we found relatively high number of ghrelin IR cells.

Calves fed with Jerusalem artichoke flour concentrate containing 6 g/d medium and 12 g/d higher dose of inulin and receiving the same feed, the ghrelin IR cells in the abomasum had significantly less than the control and calf group fed the lowest dose of PreG6 (Table 6). This shows that feeding of Jerusalem artichoke flour powder, at least 12 g/day, containing 6 g of inulin for 56 days, significantly improves food intake and feed digestion in 12-week-old calves, thus reducing the feeling of hunger. However, it must be admitted that contrary to the predicted, 0.25 g of probiotics *Enterococcus faecium* ( $2 \times 10^9$  CFU/g) addition to the medium and highest dose of inulin (6 and 12 g) the result did not improve significantly. The number of ghrelin IR cells did not show significantly better results when comparing the results of the respective prebiotic and synbiotic groups.

## CONCLUSIONS

1. Feeding the average and highest dose of Jerusalem artichoke flour concentrate (12 and 24 g/d) and its combination with 0.25 g - *E. faecium* ( $2 \times 10^9$  CFU/g) as a synbiotic all three doses (6, 12, 24 g/d) significantly ( $p < 0.01$ ) improves live weight gain in calves during the transition to ruminants and cold carcass weight.
2. Feeding of Jerusalem artichoke flour concentrate 12 g/d as well 0.25 g of *E. faecium* in combination with 12 g/d and 24 g/d significantly (at least  $p < 0.05$ ) improved the growth and development of the rumen and abomasum, as shown by masometric and morphometric measurements of these parts of the stomach.
3. Feeding of Jerusalem artichoke meal concentrate and synbiotics was not significantly affecting the general health status and faecal consistency of all groups of animals. However, the combination of a medium dose of Jerusalem artichoke flour concentrate 12 g/d and especially the feeding of the same dose with *E. faecium*, provided a more consistent and species-specific faecal consistency throughout the study.
4. Hematological analyzes showed that feeding of the mean and highest dose of Jerusalem artichoke flour concentrate and all three doses of newly created synbiotics significantly (at least  $p < 0.05$ ) increases erythrocytes and lymphocyte counts and hematocrit, but decreases platelet and leukocyte counts. We observed this tendency especially for 6 - 8 week old calves.
5. Feeding the medium and the highest doses of Jerusalem artichoke flour concentrate (12 and 24 g/d) significantly (at least  $p < 0.05$ ) increased the level of

total protein and gamma-glutamyl transferase, but decreased blood levels of alkaline phosphatase, glucoses and albumin in 8 - 12 week old calves. Feeding the lowest and average dose of the synbiotic significantly ( $p < 0.01$ ) increases total protein levels, but significantly ( $p < 0.05$ ) reduces alkaline phosphatase activity in calves at 12 weeks of age.

6. Feeding of medium (12 g/d) and highest (24 g/d) doses of Jerusalem artichoke flour concentrate significantly increased ( $p < 0.05$ ) the pH level of the rumen content compared to the calves of the control group, thus creating a favorable environment for cellulolytic bacteria.

7. Feeding of medium dose (12 g/d) of Jerusalem artichoke flour concentrate, increased the width of papillae of rumen *saccus ventralis et dorsalis* parts and muscle layer thickness. Addition of probiotics *E. faecium* to Jerusalem artichoke flour concentrates (containing inulin) significantly (at least  $p < 0.05$ ) increased the length and width of the rumen papillae, but decreased the thickness of the muscle layer of the rumen *saccus ventralis et dorsalis* parts. All Jerusalem artichoke flour concentrate and newly created synbiotic doses significantly increased the length and width of the villi of the small intestine (jejunum) and the depth of the colon crypts.

8. Feeding for 56 days of Jerusalem artichoke flour concentrate (except 12 g/d dose) and all newly formed synbiotic doses significantly ( $p < 0.01$ ) increased immunoglobulin A expression in the colon mid part tissues in calves at 12 weeks of age, providing higher mucosa immunity of intestines compared to control animals.

9. Feeding calves with Jerusalem artichoke flour concentrate (24 g/d) and newly formed synbiotics (12 and 24 g/d), possibly, ensures a longer feeling of satiety, as evidenced by a significantly ( $p < 0.01$ ) lower number of ghrelin immunoreactive cells in fundalis part of the abomasum and higher cold carcass weight at slaughter. The addition of synbiotic *E. faecium* to Jerusalem artichoke flour concentrate did not significantly improve these results.

## PROPOSALS

Based on the results of our study, for improving the productivity and development of calves we can recommend the feeding of calves with the average dose 12 g/d of Jerusalem artichoke flour concentrate (contains the prebiotic inulin - 6 g).