

3
4
5 **ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

6
7 **I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ:**

8
9 **1. Датум и назив органа који је именовео комисију:**

10 14. фебруар 2018, 183. седница Наставно-научног већа Факултета ветеринарске
11 медицине

12
13 **2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива**
14 **уже научне области за коју је изабран у звање, годином избора у звање и назив**
15 **факултета, установе у којој је члан комисије запослен:**

- 16
17 • др Данијела Кировски, редовни професор, ужа научна област Физиологија,
18 2016. година, Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду –
19 ментор
20
21 • др Горан Корићанац, научни саветник, 2013. година, ужа научна област
22 Природно-математичке науке - молекуларна ендокринологија, Институт за
23 нулеарне науке "Винча" Универзитета у Београду-ментор
24
25 • др Иван Вујанац, ванредни професор, ужа научна област Болести папкара,
26 2017. година, Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду
27
28 • др Радиша Продановић, доцент, ужа научна област Болести папкара, 2017.
29 година, Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду
30
31 • др Сања Врањеш –Ђурић, научни саветник, 2012. година, ужа научна област
32 Природно-математичке науке – биохемија, Институт за нуклеарне науке "Винча"
33 Универзитета у Београду
34
35
36

37 **II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:**

38
39 **1. Име, име једног родитеља, презиме:**

40 Марија Мијодраг Пантелић

41 **2. Датум рођења, општина, Република:**

42 18.03.1981. Земун, Србија

43 **3. Датум одбране, место и назив магистарске тезе*:**

44 **4. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука*:**

45
46 **III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:** Утицај пероралне апликације хрома на
47 ендокрини и метаболички статус крава холштајн расе
48

49 **IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (навести броја страна поглавља, слика,**
50 **шема, графикона и сл.):** Докторска дисертација кандидата Марије Пантелић написана
51 је на 149 страна и садржи следећа поглавља: Увод (3 стране), Преглед литературе (33
52 страна), Циљ и задаци истраживања (2 стране), Материјал и методе рада (15 страна),
53 Резултати истраживања (44 страна), Дискусија (18 страна), Закључци (2 стране),
54 Литература (32 стране). Последње четири стране су биографија и изјаве. Захвалница и
55 кратак садржај на српском и енглеском језику налази се у првих 7 страна. У дисертацији
56 се налази 6 табела (1 табела у поглављу Материјал и методе рада и 5 табела у
57 поглављу Резултати), 14 слика (3 слике у поглављу Преглед литературе и 11 у
58 поглављу Резултати) и 21 графикон (у поглављу Резултати).
59

1 **V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ (дати кратак**
2 **опис сваког поглавља дисертације: увода-до 250 речи, прегледа литературе-до**
3 **500 речи, циља и задатака истраживања-није ограничено, материјал и метода-**
4 **није ограничено, резултата није ограничено, дискусије-до 100 речи, списка**
5 **референци-навести број референци у докторској дисертацији):**
6

7 У **Уводу** кандидат описује методе које су последњих деценија коришћене у циљу
8 повећања млечности код крава. Почетна истраживања су била усмерена на
9 побољшање стандарда везаних за исхрану уз генетски контролисану вештачку
10 инсеминацију крава. Међутим, остварена висока производња млека, као значајан стрес
11 за животињу, је често била праћена метаболичким болестима. Стога се последњих
12 година велики број истраживача бави испитивањем ендокрино-метаболичког статуса
13 крава, посебно у перипарталном периоду (3 недеље пре до 3 недеље после тељења)
14 када се метаболичке болести најчешће јављају из разлога што су промене у том
15 периоду управо усмерене на правилну адаптацију крава на високу производњу која
16 прати почетак латације. Једна од карактеристика метаболизма крава у том периоду је
17 појава инсулинске резистенције која је корисна за развој плода у касној фази
18 гравидитета као и за производњу млека у раној фази лактације али може бити
19 неповољна за метаболички статус мајке, поготово уколико је значајно изражена и
20 уколико почне пре но што је то физиолошки оправдано. Манипулација инсулинском
21 резистенцијом могућа је употребом хрома, што је доказано код великог броја врста
22 животиња, а први пут код лабораторијских глодара. Показано је да хром повећава број
23 инсулинских рецептора (IR) и њихов афинитет за инсулин, као и да утиче на
24 мобилизацију инсулин зависних транспортера за глукозу (GLUT4-glucose transporter) на
25 површину инсулин сензитивних ћелија, поспешујући улазак глукозе у периферна ткива.
26 Кандидат у уводу указује на недостатак литературних података о утицају хрома на
27 инсулински сигнални пут код крава сматрајући да би оваква испитивања допринела
28 појашњавању улоге хрома у метаболизму крава током перипарталног периода, када је
29 животиња изложена највећем стресу.
30

31 **Преглед литературе** је подељен у три подпоглавља.

32 У првом подпоглављу кандидат описује ендокрино-метаболички статус крава у
33 перипарталном периоду, који карактерише престојавање метаболизма због преласка
34 јединке из стања гравидитета у стање лактације. У наставку истиче да је губитак
35 апетита који се јавља у периоду око тељења одговоран за настанак негативног биланса
36 енергије (NEB-Negative energy balance) и наводи да су животиње у овој фази
37 производно-репродуктивног циклуса приморане да мобилишу сопствене телесне
38 резерве у циљу надокнађивања недостатка у енергији. Кандидат даље указује на
39 значај активације инсулинске осовине за преусмеравање хранљивих материја према
40 физиолошки задатим приоритетима и истиче да високомлечне расе крава имају ниже
41 концентрације инсулина у поређењу са неселекционираним кравама што им омогућава
42 високу продуктивност. Затим наводи податке везане за утицај инсулина на
43 метаболизам угљених хидрата, масти и протеина, као и значај инсулинске резистенције
44 која се јавља код крава током перипарталног периода. Кандидат посебно наглашава да
45 су литературни подаци везани за тумачење молекуларних механизми настанка
46 инсулинске резистенције врло оскудни.

47 У другом подпоглављу кандидат детаљно описује инсулинску осовину, односно
48 синтезу, секрецију и разлагање инсулина, али и молекуле инсулинског сигналног пута:
49 рецептор за инсулин (IR β), супстрате инсулинског рецептора фосфорилисаног на
50 серину 307 (pIRS-1 Ser³⁰⁷), протеинску киназу Б фосфорилисане на серину 437 (pAKT
51 Ser⁴⁷³) као и GLUT4. На крају овог подпоглавља кандидат детаљно описује метаболички
52 пут који је се активира након везивања инсулина за α субјединицу рецептора, а за
53 последицу има транслокацију GLUT4 на инсулин сензитивним ћелијама.

54 У трећем подпоглављу кандидат наводи литературне податке везане за хром,
55 укључујући његове хемијске особине, валентна стања, биорасположивост након
56 ресорпције, доступност у појединим ћелијама, склоност депоновању и излучивању.
57 Описана су досадашња сазнања о утицају хрома на сигнални пут инсулина почевши од
58 раних истраживања која су изведена на мишевима и пацовима, до последњих која су
59 изведена на култури ћелија у *in vitro* условима. У даљем тексту кандидат описује улогу
60 хрома у активацији IR, али и молекула који су релевантни за даљи пренос сигнала са

1 активираниг IR (IRS-1, Akt, PI3K и GLUT4). Коришћени су литературни подаци везани за
2 истраживања која су обављена како у *in vivo* тако и у *in vitro* условима.

3 У последњем делу прегледа литературе кандидат наглашава да је заинтересованост
4 истраживача за испитивање улоге хрома код крава значајно порасла. Прва
5 истраживања на преживарима отварају могућност да хром утиче на метаболизам
6 угљених хидрата код говеда на сличан начин као код глодара и људи. Међутим
7 неусаглашеност литературних података у погледа утицају хрома на млечност крава
8 отвара могућност да постоје одређене специфичности које, могуће, зависе од облика и
9 концентрације хрома који је коришћен као додаток у храни, начина и дужине апликације
10 али и механизма деловања у ткивима.

11 **Циљ истраживања** у оквиру ове докторске дисертације је био да се испита утицај
12 пероралне апликације хрома (органиски тровалентни хром везан за квасац) на активност
13 инсулинске осовине код крава током перипарталног периода, као и његов утицај на
14 млечност током ране лактације. Очекивало се да ће добијени резултати детаљније
15 разјаснити метаболичку улогу хрома код крава, узимајући у обзир његову улогу у
16 повећању активности инсулина која се одиграва након трансформације апликованог
17 хрома у физиолошки активан молекул назван фактор толеранције глукозе (GTF-glucose
18 tolerance factor).

19
20 Како би се постигао циљ, постављени су следећи истраживачки задаци:

- 21 (1) третирати краве (од прве до четврте лактације) органиским препаратом
22 тровалентног хрома везаним за квасац (Co-Factor III Cr Yeast, *Alltech*). Доза
23 хрома према препоруци произвођача и на основу литературних података по
24 просечном грлу је 10 mg, односно 5 g препарата са органиски везаним хромом
25 (0,2 % Cr³⁺ у препарату Co-Factor III Cr Yeast) који је свакодневно даван огледној
26 групи крава у периоду од 25. дана пре очекиваног термина тељења до 30. дана
27 после тељења, употребом езофагеалне тубе;
- 28 (2) Узорке мишићног и масног ткива узимати 30. дана (пре апликације хрома) и 10.
29 дана пре очекиваног термина тељења, а затим 7 и 28 дана након тељења, а
30 узорке јетре узимати 10 дана пре очекиваног термина тељења као и 7 дана
31 после тељења методом перкутане биопсије;
- 32 (3) У узорцима ткива јетре, мишићног и масног ткива *Western blot* методом испитати
33 заступљености протеина инсулинског рецептора (IR β), протеина супстрата
34 инсулинског рецептора фосфорилисаног на серину 307 (pIRS-1 Ser³⁰⁷) и протеин
35 киназе Б фосфорилисане на серину 473 (pAKT Ser⁴⁷³), односно заступљеност
36 протеина GLUT4 само у мишићном и масном ткиву, где су и присутни;
- 37 (4) Испитати функционално стање и одговор β ћелија панкреаса праћењем
38 динамике кретања концентрације глукозе и инсулина у интравенском тесту
39 оптерећења глукозом (IVGTT-*intravenous glucose tolerance test*) који ће се током
40 трајања огледа изводити четири пута и то 28 и 7. дана пре очекиваног термина
41 тељења као и 10. и 30. дана после тељења;
- 42 (5) Поредодређивања концентрација инсулина и глукозе у свим узорцима крви
43 добијеним током IVGTT, одредити концентрације кортизола и одређених
44 биохемијских параметара крви (NEFA, ВНВА, укупни протеини, албумини, уреа,
45 укупан билирубин, калцијум, фосфор, магнезијум, холестерол, триглицериди),
46 као и активност AST и GGT у нултим узорцима крвног серума добијеним
47 непосредно пре извођења IVGTT;
- 48 (6) Израчунати вредност RQICKY (*Revised quantitative insulin sensitivity check index*)
49 као математичког показатеља инсулинске резистениције код крава;
- 50 (7) Оценити телесну кондицију (BCS-*body condition score*) 30. и 10. дана пре
51 очекиваног термина тељења као и 7. и 28. дана после тељења, као и унос суве
52 материје (DMI- *dry matter intake*) 4. и 1. недеље пре очекиваног термина тељења
53 и 1. и 4. недеље после тељења;
- 54 (8) Пратити млечност крава од 1. до 14. недеље лактације и сакупити
55 репрезентативне узорке млека 7. и 28. дана лактације за утврђивање састава
56 млека (процента млечне масти, протеина лактозе) и за израчунавање ЕСМ
57 (*energy corrected milk yield*).

1 **Материјал и методе рада** су детаљно описани у посебном поглављу. На почетку
2 огледа краве холштајн расе у касној фази гравидитета су подељене у две групе: краве
3 контролне групе (-Cr, n=10) и краве огледне групе (+Cr, n=10). Група +Cr је свакодневно
4 поред стандардног оброка перорално добијала хром органски везан за квасце (Co-
5 Factor III Cr Yeast, *Alltech*). Хром, у дози од 10mg, односно по 5 g препарата по грлу
6 дневно је додаван преко езофагеалне тубе почев од 25. дана пре очекиваног термина
7 тељења до 30. дана после тељења свакодневно са јутарњим obroком јер се очекивало
8 да ће та количина имати утицај на активност инсулинске осовине код кржава. Доза хрома
9 је одређена претходним мерењем телесне масе животиња. Препоручена доза хрома од
10 стране произвођача и на основу литературних података по просечном грлу је 10 mg,
11 односно 5 g препарата са органски везаним хромом за квасце (препарат садржи 0,2 %
12 Cr³⁺). Обе групе су током извођења огледа добијале потпуно измешани оброк два пута
13 дневно, при чему су састав и количина оброка били усклађени са потребама за дату
14 фазу производно-репродуктивног циклуса кржава.

15
16 Узорци мишићног ткива су узети перкутаном биопсијом *m. semitendinosus*, узорци
17 масног ткива у регији корена репа, а узорци јетре перкутаном биопсијом помоћу
18 модификованог биопсера. Биопсија узорака мишићног и масног ткива је урађена 30. и
19 10. дана пре очекиваног термина тељења као и 7. и 28. дана после тељења. Узорци
20 јетре су узимани 10 дана пре очекиваног термина тељења као и 7 дана после тељења.

21
22 У узорцима мишићног, масног ткива и ткива јетре одређивана је заступљеност протеина
23 укључених у сигнални пут инсулина: Irβ, pIRS-1 Ser³⁰⁷ и pAKT Ser⁴⁷³, а GLUT4 је
24 одређиван само у мишићном и масном ткиву у којима је присутан. Анализе
25 заступљености протеина и фосфорилације молекула инсулинског сигналног пута су
26 одређиване *Western blot* методом. Квантификација добијених сигнала вршена је
27 дензитометријски коришћењем софтвера ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).

28
29 Узорци крви узимани су пункцијом *v. jugularis*. Након спонтане коагулације на собној
30 температури серум је издвајан центрифугирањем на 1000 x g током 20 минута.
31 Добијени крвни серум је складиштен на температури -20°C, све до извођења анализа.

32
33 У узорцима крвних серума добијених 28. и 7. дана пре очекиваног термина као и 10. и
34 30 дана после тељења одређивана је концентрација глукозе, бетахидрокси бутерне
35 киселине (BHBA), неестерификованих масних киселина (NEFA), укупног билирубина
36 (TB), укупних протеина, албумина, урее, калцијума, фосфора, магнезијума,
37 холестерола, триглицерида (TG), активности AST и GGT, инсулина и кортизола.

38
39 Концентрације глукозе, BHBA, NEFA, TB и урее, као и активност GGT су мерени
40 коришћењем комерцијалних дијагностичких китова Randox, Crumlin (Велика Британија).
41 Концентрације укупних протеина, албумина и P, као и активност AST су одређене
42 комерцијалним дијагностичким китом Spinreact (Шпанија). Концентрације Ca су мерене
43 комерцијалним дијагностичким китом Clinichem (Мађарска). Концентрације Mg, TG и
44 холестерола су измерене комерцијалним дијагностичким китом Pointe scientific (SAD).
45 Концентрација NEFA одређивана је коришћењем ензимске колориметријске методе уз
46 помоћ комерцијалних дијагностичких китова (Randox, Crumlin, Велика Британија)

47
48 Сви биохемијски параметри измерени у крвном серуму су одређени на
49 полуаутоматском биохемијском анализатору STAT FAX 3300 AVRENESS TECHNOLOGY
50 INC (SAD). За одређивање концентрације инсулина и кортизола коришћени су
51 комерцијални RIA тестови (INER, Београд, Србија).

52
53 IVGTT је урађен на укупно 12 кржава (n=6 кржава по групи) четири пута током испитиваног
54 периода и то 28. и 7. дана пре очекиваног термина као и 10. и 30 дана после тељења,
55 непосредно након узорковања крви за биохемијске анализе. Апликован је 50% раствор
56 глукозе (глукоза 2,78 mol/L wt/vol; Зорка Шабац, Србија) болус инфузијом у дози од
57 500mg/kg телесне масе. Непосредно пре давања раствора глукозе узоркована је крв
58 (нулто време). Накнадни узорци крви су узимани 15., 30., 60., 90. и 120. минута након
59 давања глукозе. Концентрације глукозе и инсулина су одређиване у свим узорцима.

60

1 Кинетика глукозе током IVGTT је одређена коришћењем следећих параметра: базална
2 концентрација глукозе (T_{0glu}), степен опадања концентрације глукозе током теста (k),
3 полувреме елиминације глукозе ($T_{1/2}$) и површина испод криве глукозе током теста
4 толеранције праћена од 0. до 120. минута (AUC_{glu}). Кинетика инсулина током IVGTTе
5 одређена коришћењем следећих параметра: базална концентрација инсулина (T_0),
6 највиша концентрација инсулина (Ins_{peak}), пораст инсулина (ΔMAX_{ins}) и површина испод
7 криве инсулина током теста толеранције праћена од 0. до 120. минута (AUC_{ins}).

8 За процену инсулинске резистенције код крава је коришћен математички израчунат
9 показатељ RQUICKI добијен помоћу формуле $RQUICKI = 1 / [\log \text{ глукоза (mg / dl) + log}$
10 $\text{ инсулин (iU / ml) + log NEFA (mmol / L)]$, при чему су коришћене базалне вредности
11 глукозе, инсулина и NEFA у IVGTT. Ниска вредност индекса означава смањену
12 остелјивост на инсулин.

13
14 Млечност је мерена једанпут недељно и одређивана је као просечна вредност четири
15 узастопне muže, од 1. до 14. недеље лактације коришћењем опреме Milk master
16 (DeLaval, Australia). Узорци млека су чувани у калијум дихромату на 4°C до извођења
17 анализа састава млека: млечне масти, протеина и лактозе (LactoScope C4; Delta
18 Instruments, the Netherlands) као и за израчунавање ECM. Анализе састава млека
19 рађене су 7 и 28. дана лактације.

20
21 BCS је мерен 30. и 10. дана пре очекиваног термина тељења као и 7. и 28. дана после
22 тељења коришћењем скале од 1 до 5 уз интервале од 0,25, при чему је 1 значило врло
23 мршаву а 5 веома угојену краву.

24
25 DMI је мерен током 2 узастопна дана у недељи и то 4. и 1. недељу пре очекиваног
26 термина тељења и 1. и 4. Недељу после тељења, одузимањем количине миксираног
27 оброка који је преостао на крају дана од количине која је достављена.

28
29 Сви резултати су представљени табеларно или графички коришћењем параметара
30 дескриптивне статистике: средња вредност \pm стандардна грешка средње вредности.
31 Статистичка обрада података је извршена коришћењем софтверског пакета
32 STATISTICA v.8 (StatSoft, Inc., Tulsa, Ok, USA). Значајност разлике између просечних
33 концентрација испитиваних параметара је процењивана коришћењем *two-way ANOVA*
34 теста са две варијабле (третман и време), док је *one way ANOVA* коришћена да би се
35 проценила значајност за параметре који су мерени само два пута током извођења
36 огледа, као и за млечност. Разлике су означене као значајне на нивоима $p < 0,05$, $p < 0,01$
37 и $p < 0,001$, с тим да су у резултатима приказане и разлике које су имале тенденцију
38 значајних промена ($0,05 < p < 0,10$).

39
40 **Резултати** су приказани одвојено за (1) заступљеност протеина сигналног пута
41 инсулина у мишићном, масном ткиву и јетри; (2) математички изведене параметре
42 динамике промена концентрација глукозе и инсулина током IVGTT; (3) концентрације
43 биохемијских параметара и хормона у крви; (4) млечност и састав млека, унос суве
44 материје и оцену телесне кондиције.

45 У **мишићном ткиву**, на почетку огледа, односно пре почетка пероралне апликације
46 хрома, није постојала статистички значајна разлика у заступљености $IR\beta$, $pIRS-1 Ser^{307}$,
47 $pAKT Ser^{473}$ и $GLUT4$ између -Cr и +Cr групе.

48 Заступљеност $IR\beta$, 10 дана пре очекиваног термина тељења, била је статистички
49 значајно већа ($p=0,04$) код +Cr у односу на -Cr групу. У оба испитивана периода након
50 тељења није утврђена статистичка значајна разлика између -Cr и +Cr групе.
51 Поређењем унутар група, у -Cr групи заступљености $IR\beta$ је била значајно смањена
52 ($p < 0,05$) 10. у односу на 30. дан пре очекиваног термина тељења.

53 У оба испитивана периода након тељења заступљеност протеина $pIRS-1 Ser^{307}$ је била
54 значајно нижа ($p < 0,05$ и $p < 0,001$, појединачно) у мишићном ткиву +Cr у поређењу са -Cr.
55 Код -Cr групе крава, 10 дана пре очекиваног термина тељења, забележено је значајно
56 смањење заступљености $pIRS-1 Ser^{307}$ ($p=0,0001$) у поређењу са периодом 30 дана пре
57 тељења. У оба периода након тељења у -Cr групи заступљеност $pIRS-1 Ser^{307}$ је била
58 статистички значајно већа од заступљености на почетку огледа ($p < 0,001$, појединачно).

1 Између испитиваних група, као и унутар сваке групе појединачно, нису утврђене
2 значајне промена у заступљености pAKT Ser⁴⁷³ у мишићном ткиву током периода
3 извођења огледа.

4 Између испитиваних група, као и унутар сваке групе појединачно, нису утврђене
5 значајна промена у заступљености GLUT4 у мишићном ткиву током периода извођења
6 огледа.

7
8 У **супкутаном масном ткиву** није утврђена статистички значајна разлика у
9 заступљености IR β , pIRS-1 Ser³⁰⁷, pAKT Ser⁴⁷³ и GLUT4 између -Cг и +Cг групе на
10 почетку огледа, односно пре пероралне апликације хрома.

11 Између испитиваних група, као и унутар сваке групе појединачно, нису утврђене
12 значајне промене у заступљености IR β , односно pIRS-1 Ser³⁰⁷ током периода извођења
13 огледа.

14 Резултати анализе заступљености протеина pAKT Ser⁴⁷³ у узорцима супкутаног масног
15 ткива нису показале статистички значајну разлику између група, али је у -Cг групи 10.
16 дана пре очекиваног термина заступљеност овог протеина била значајно повишена
17 ($p=0,04$) у односу на 30. дана пре тељења.

18 Резултати анализе заступљености протеина GLUT4 у узорцима супкутаног масног ткива
19 нису показале статистички значајну разлику између група. У -Cг групи 28. дана после
20 тељења експресија GLUT4 је била статистички значајно нижа ($p=0,005$) у односу на 30.
21 дан пре очекиваног термина тељења.

22
23 У **јетри** није утврђена статистички значајна разлика у заступљености IR β између -Cг и
24 +Cг групе у оба испитивана периода, док је заступљеност pIRS-1 Ser³⁰⁷ била
25 статистички значајно нижа ($p<0,05$) у +Cг него у -Cг групи крава само 10 дана пре
26 тељења. Није утврђена статистички значајна разлика у заступљености pAKT Ser⁴⁷³
27 између -Cг и +Cг групе у периоду пре тељења, док је 7. дана након тељења
28 заступљеност pAKT Ser⁴⁷³ у ткиву јетре +Cг групе била статистички значајно већа
29 ($p<0,01$) у односу на -Cг. Унутар -Cг групе, заступљеност протеина pAKT Ser⁴⁷³ је
30 значајно смањена ($p<0,001$) 7 дана након тељења, у односу на 10. дан пр очекиваног
31 термина тељења. У крава

32
33 Током **IVGTT** изведеног непосредно пре апликације хрома (28. дана пре тељења)
34 трендови промена концентрације глукозе и инсулина били су врло слични код -Cг и +Cг
35 групе, с обзиром да ни у једном минуту теста није утврђена статистички значајна
36 разлика у концентрацијама испитиваних параметара између група.

37 Током другог IVGTT изведеног 7 дана пре тељења тренд промене концентрације
38 глукозе током IVGTT није био значајно различит између -Cг и +Cг док је инсулински
39 одговор био значајно израженији код -Cг у односу на +Cг групу 15., 30. и 60. минута,
40 када је концентрација инсулина била значајно већа код -Cг у односу на +Cг групу
41 ($p=0,03$, $p=0,016$ и $p=0,017$, појединачно).

42 Током трећег IVGTT изведеног 10 дана после тељења пик концентарције глукозе који је
43 постигнут у 15. минуту теста у -Cг групи је био статистички значајно већи ($p=0,019$) у
44 односу на +Cг групу. Тренд промене концентрације глукозе у наставку теста је био
45 сличан у обе групе, с обзиром да није утврђена значајна разлика у гликемији између
46 група. Инсулински одговор праћен у истом периоду је био значајно израженији код +Cг
47 групе, јер је концентарција инсулина у +Cг групи била значајно већа него у -Cг групи у
48 15. и 90. минуту ($p=0,027$ и $p=0,018$, појединачно).

49 У четвртм IVGTT изведеном 30. дана после тељења концентрација глукозе је постигла
50 максимум 15. минута након давања глукозе код -Cг и била је статистички значајно већа
51 ($p=0,011$) у односу на +Cг групу. Тренд промене концентрације глукозе у наставку теста
52 је био сличан у обе групе, с обзиром да није утврђена значајна разлика у гликемији
53 између група. Инсулински одговор није показао значајније разлике између група.

54
55 Анализа **параметара кинетике глукозе** између различитих IVGTT је показала да су
56 вредности T_{0glu} једино код +Cг групе у IVGTT изведеним 10 и 30 дана после тељења
57 биле значајно ниже у односу на вредност одређену у IVGTT 7. дана пре тељења
58 ($p<0,05$, појединачно). Није утврђена значајна разлика у k и $T_{1/2}$ унутар и између група
59 поређењем IVGTT. Код +Cг групе вредности AUC_{glu} су биле значајно више ($p<0,05$) 7.

1 дана пре тељења ($837,54 \pm 32,14$) у односу на вредност добијену 28. дана пре тељења ($732,21 \pm 36,58$) као и 30. дана после тељења ($674,13 \pm 23,40$).

3 Анализа **параметара кинетике инсулина** између различитих IVGTT је показала да се секреција инсулина разликовала између -Cг и +Cг групе 7 дана пре тељења као и 10 дана после тељења. Седмог дана пре тељења INS_{peak} ($102,86 \pm 11,40 \mu U/ml$), ΔMAX_{ins} ($81,26 \pm 9,36$) и AUC_{ins} ($7513,94 \pm 795,29$) су били значајно нижи ($p < 0,05$, појединачно) у +Cг у поређењу са -Cг групом код које су вредности INS_{peak} , ΔMAX_{ins} и AUC_{ins} износиле $140,07 \pm 16,16 \mu U/ml$, $116,63 \pm 14,50$ и $10277,88 \pm 976,99$, док су 10. дана после тељења сви параметри кинетике инсулина (INS_{peak} , ΔMAX_{ins} и AUC_{ins}) били значајно виши у +Cг групи ($148,65 \pm 19,58 \mu U/ml$; $134,09 \pm 19,01$ и $11388,08 \pm 1308,94$) у поређењу са -Cг за исте параметре ($112,52 \pm 11,68 \mu U/ml$; $97,83 \pm 10,83$ и $8341,13 \pm 867,22$).

13 Вредности **RQUICKI** нису показале статистички значајне разлике између група током периода испитивања. У +Cг групи, RQUICKI је био значајно нижи ($p < 0,05$) 10 дана после тељења ($0,345 \pm 0,01$) у односу на вредност добијену 28. и 7. дана пре тељења ($0,485 \pm 0,02$ и $0,398 \pm 0,01$, појединачно) док су у -Cг групи вредности RQUICKI биле релативно константне.

19 Концентрације NEFA су биле значајно више код -Cг него +Cг групе 7. дана пре тељења и 30 дана после тељења ($p < 0,05$, појединачно), док су биле статистички значајно ниже ($p < 0,05$) 10 дана после тељења. Гликемија је у обе групе била значајно нижа после тељења. Између гликемија измерених код -Cг и +Cг групе статистички значајна разлика ($p < 0,05$) је утврђена само 10. дана после тељења. Није установљена статистички значајна разлика између група у концентрацијама BHBA, укупних протеина, урее, холестерола, ТВ, Mg, Ca, P као ни у концентрацијама инсулина нити у једном од испитиваних периода. Концентрација албумина је једино 30 дана после тељења била значајно нижа ($p < 0,05$) код +Cг у односу на -Cг групу. Концентрације TG су -Cг групи, у односу на +Cг, биле значајно ниже ($p < 0,05$) 10 дана после тељења а значајно више ($p < 0,05$) 30 дана после тељења. Значајно виша активност AST код +Cг, у односу -Cг групу, утврђена је 10. дана после тељења ($p < 0,05$), док је активност GGT била значајно виша код код -Cг у односу на +Cг групу само 30. дана после тељења.

33 Концентрација **кортизола** је била статистички значајно нижа у +Cг групи, у поређењу са -Cг, 7. дана пре тељења ($p < 0,001$) и 30 дана после тељења ($p < 0,05$).

36 **Млечност крава** је била статистички значајно нижа код +Cг групе у односу на -Cг током читавог испитиваног периода, изузев у 6. и 7. недељи лактације када је млечност била такође нижа, али не значајно. ECM је била код +Cг групе у односу на -Cг групу статистички значајно нижа 1. дана лактације ($p < 0,001$), док је 28. дана показивала тенденцију да буде нижа ($p = 0,06$). Процент млечне масти, протеина и лактозе се нису статистички значајно разликовале између група 7. и 28. дана лактације. Како је лактација одмицала, ECM је статистички значајно расла само у +Cг групи док је проценат протеина статистички значајно опадао у обе групе.

45 Суплементација хромом је утицала на **DMI**, као и на **BCS** током препарталног, али не и током постпарталног периода. DMI и BCS су били статистички значајно виши ($p < 0,05$, појединачно) у +Cг групи у поређењу са -Cг 10. дана пре тељења

49 У поглављу **Дискусија**, кандидат је размотрио добијене резултате и упоредио их са доступним подацима из домаће и стране литературе.

52 VI ЗАКЉУЧЦИ ИСТРАЖИВАЊА (навести закључке који су приказани у докторској дисертацији):

55 1. Перорално апликовани хром је, у мишићном ткиву, изазвао значајно повећање заступљености инсулинских рецептора ($IR\beta$) 10. дана пре очекиваног термина тељења, као и значајно смањење садржаја супстрата инсулинског рецептора ($pIRS-1 Ser^{307}$) у оба периода испитивања после тељења, док није имао утицаја на садржај $pAKT Ser^{473}$ и GLUT4. У супкутаном масном ткиву апликовани хром није остварио статистички значајан ефекат на испитиване молекуле инсулинског сигналног пута, док је у јетри

1 изазвао значајно смањење садржаја pIRS-1 Ser³⁰⁷ 10. дана пре тељења, а значајно
2 повећање pAKT Ser⁴⁷³ 7. дана после тељења.

3 2. Резултати добијени у IVGTT су у складу са налазима у периферним ткивима и
4 јетри крава на молекуларном нивоу и заједнички иду у прилог закључку да су ткива
5 групе крава којој је апликован хром инсулин сензитивнија и да се глукоза значајно боље
6 користи у мишићном ткиву тих крава. Од параметара кинетике глукозе који доприносе
7 овом закључку су значајно ниже вредности AUC_{glu} код групе која је примила хром, а од
8 параметара кинетике инсулина значајно ниже вредности INS_{peak}, ΔMAX_{ins} као и AUC_{ins} 7.
9 дана пре очекиваног термина тељења, односно значајно више вредности 10. дана
10 после тељења. Иако QUICKI вредности нису потврдиле значајну разлику у инсулинској
11 сензитивности између група, смањено ослобађање инсулина после тељења
12 комбиновано са изостанком у промени k вредности могу указивати на повећану
13 инсулинску сензитивност у групи крава којој је апликован хром.

14
15 3. Концентрације кортизола су статистички значајно снижене под утицајем
16 апликованог хрома 7. дана пре очекиваног термина тељења као и 30. дана после
17 тељења, указујући на могући ефекат хрома на ублажавање стреса током перипарталног
18 периода.

19
20 4. Код крава којима је апликован хром, унос суве материје и оцена телесне
21 кондиције су били значајно већи само током препарталног периода, указујући на
22 преусмеравање енергетског метаболизма ка депоновању хранљивих материја у
23 периферна ткива.

24
25 5. Просечна млечност и ЕСМ код крава којима је апликован хром била је значајно
26 нижа током периода ране лактације. Смањена млечност је вероватно последица
27 преусмеравања глукозе ка периферним ткивима уместо у млечну жлезду где се користи
28 за синтезу лактозе, а тиме повећање млечности.

29 30 **VII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА** 31 **(навести да ли су добијени резултати у складу са постављеним циљем и** 32 **задацима истраживања, као и да ли закључци произилазе из добијених** 33 **резултата):**

34
35 Резултати истраживања, које је у оквиру израде докторске дисертације спровео
36 кандидат, су у потпуности у складу са постављеним циљем и задацима истраживања.
37 Добијени резултати су приказани табеларно и графиконима, а њихов опис је дат
38 логичним редоследом, прегледно, јасним и разумљивим стилем. Изведени закључци су
39 јасно формулисани и у складу са постављеним циљем и добијеним резултатима
40 истраживања.

41 42 **VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

43 44 **1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави** 45 **теме?**

46 Докторска дисертација кандидата Марије Пантелић под насловом „Утицај пероралне
47 апликације хрома на ендокрини и метаболички статус крава холштајн расе“ је написана
48 у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

49 **2. Да ли дисертација садржи све елементе прописане за завршену докторску** 50 **дисертацију?**

51 Докторска дисертација кандидата Марије Пантелић под насловом „Утицај пероралне
52 апликације хрома на ендокрини и метаболички статус крава холштајн расе“ садржи све
53 битне елементе у складу са захтевима за завршену докторску дисертацију.

54 **3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?**

55 У оквиру ове докторске дисертације извршено је свеобухватно испитивање утицаја
56 перорално апликованог хрома на инсулинску осовину крава током перипарталног
57 периода у *in vivo* условима. Добијени резултати о местима интеракције перорално
58 апликованог хрома и молекула сигналног пута инсулина су први такве врсте у научним
59 радовима и омогућавају даља истраживања везана за могућности модулације
60 метаболизма крава током перипарталног периода од стране хрома,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

IX ПРЕДЛОГ:

На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже (одабрати једну од три понуђених могућности):

- да се докторска дисертација прихвати а кандидату одобри одбрана
- да се докторска дисертација врати кандидату на дораду
- да се докторска дисертација одбије

ДАТУМ

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

др Данијела Кировски, редовни професор,
Факултет ветеринарске медицине, Унивезитета у Београду

др Горан Корићанац, научни саветник,
Институт за нуклеарне науке „Винча“

др Иван Вујанац, ванредни професор,
Факултет ветеринарске медицине, Унивезитета у Београду

др Радиша Продановић, доцент,
Факултет ветеринарске медицине, Унивезитета у Београду

др Сања Врањеш-Ђурић, научни саветник,
Институт за нуклеарне науке „Винча“