

3  
4  
5 IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

6  
7 I PODACI O KOMISIJI:

8  
9 1. Datum i naziv organa koji je imenovao komisiju: 23.12.2015. god. 163 sednica, Nastavno-  
10 naučnog veća Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu.

11  
12 2. Sastav komisije sa naznakom imena i prezimena svakog člana, zvanja, naziva uže naučne  
13 oblasti za koju je izabran u zvanje, godinom izbora u zvanje i naziv fakulteta, ustanove u kojoj  
14 je član komisije zaposlen:

15  
16 Dr Miodrag Lazarević, redovni profesor, Fiziologija, 2002, Fakultet veterinarske medicine,  
17 Beograd

18  
19 Dr Slobodanka Vakanjac, vanredni profesor, Ginekologija sa andrologijom, 2011, Fakultet  
20 veterinarske medicine, Beograd

21  
22 Dr Aleksandar Milovanović, naučni saradnik, Reprodukcijska domaćih životinja, 2015, NIV "Novi  
23 Sad", Novi Sad

24  
25 Dr Aleksandar Stanojković, naučni saradnik, Mikrobiologija, Institut za stočarstvo, 2015,  
26 Beograd

27  
28 Dr Igor Stojanov, viši naučni saradnik, Klinička bakteriologija, 2012, NIV "Novi Sad", Novi Sad

29  
30 II PODACI O KANDIDATU:

31  
32 1. Ime, ime jednog roditelja, prezime: Saša Vladimira Mlinar

33  
34 2. Datum rođenja, opština, Republika: 21.10.1974. Zadar, Hrvatska

35  
36 3. Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze\*: np

37  
38 4. Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka\*: np

39  
40 III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE: **UTICAJ VISOKE DOZE C VITAMINA NA**  
41 **FUNKCIJE NEUTROFILNIH GRANULOCITA VISOKO-MLEČNIH KRAVA SA**  
42 **SUPKLINIČKIM MASTITISIMA**

43  
44 IV PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broj strana poglavlja, slika, šema,  
45 grafikona i sl.): Doktorska disertacija je napisana jasnim jezikom i razumljivim stilom na  
46 ukupno 286 strana teksta (font Times new Roman, 12 pt, prored 1,5) . Ona sadrži uobičajena  
47 poglavlja: **Uvod** (4 strane), **Pregled literature** (160 strana), **Cilj i zadatke istraživanja** (2  
48 strane), **Materijal i metode** (16 strana), **Rezultate** (25 strana), **Diskusiju** (24 strane),  
49 **Zaključke** (2 strane) i **Popis literature** (53 strane). Disertacija sadrži ukupno 37 tabela, 20  
50 grafikona i 46 slika i shema.

51  
52 V VREDNOVANJE POJEDINIH DELOVA DOKTORSKE DISERTACIJE (dati kratak opis  
53 svakog poglavlja disertacije: uvoda, pregleda literature, cilja i zadataka istraživanja, materijala  
54 i metoda, rezultata, diskusije, spiska referenci):

55  
56 U **Uvodu** (4 strane) kandidat je naveo razloge koji su ga opredelili za istraživanja ove vrste.  
57 On ističe značaj mastitisa u patologiji visoko-mlečnih krava i naglašava ogromne ekonomske  
58 štete koje nastaju usled ovog oboljenja sa posebnim osvrtom na supkliničke forme bolesti.  
59 Dodatno naglašava i negativne posledice prekomerne i neselektivne upotrebe antibiotika u

1 veterinarskoj medicini, kao i neophodnost primene alternativnih vidova terapije, tamo gde je to  
2 medicinski i ekonomski opravdano.

3  
4 U poglavlju **Pregled literature**, na ukupno 160 strana teksta, kandidat je izuzetno detaljno  
5 izneo trenutna naučna saznanja iz problematike svoje disertacije. Ovo poglavlje sadrži  
6 ukupno 35 slika i shema na kojima su dati grafički prikazi fizioloških i patoloških procesa koji  
7 se odvijaju mlečnoj žlezdi. Pregled literature je podeljen na sledećih šest podpoglavlja: 1.  
8 Imunski sistem – odbrambeni mehanizam tela (10 strana), 2. Leukociti – uloga u  
9 nespecifičnom imunskom odgovoru (83 strane), 3. Mastitisi krava – definicije, podela,  
10 dijagnostika i ekonomski aspekti (23 strane), 4. Mastitisi krava – prevencija i terapija (13  
11 strana), 5. Vitamin C (L – askorbinska kiselina) (29 strana) i 6. Protočna citometrija u analizi  
12 funkcije neutrofilnih granulocita (12 strana).

13  
14 U poglavlju **Cilj i zadaci istraživanja** (2 strane) kandidat je kao osnovne ciljeve istraživanja  
15 naveo: 1. Utvrđivanje stepena funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita u punoj krvi i  
16 mleku visokomlečnih krava koje su imale pozitivnu CMT reakciju (engl. *California Mastitis*  
17 *Test*) (++, +++) u periodu od 10 do 30 dana posle teljenja, kod svih grla uključenih u ogled. 2.  
18 Utvrđivanje stepena funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita u krvi i mleku svih grla u  
19 eksperimentu nakon završene terapije injekcionim preparatom C vitamina u trajanju od 5  
20 dana. 3. Poređenje vrednosti ispitivanih parametara registrovanih u tretiranoj i kontrolnoj grupi  
21 krava i određivanje stepena statističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima. 4.  
22 Utvrđivanje razlika u zastupljenosti pojedinih vrsta bakterija i broja somatskih ćelija u mleku  
23 krava pre i posle sprovedene terapije. Za realizaciju navedenih ciljeva istraživanja bili su  
24 postavljeni sledeći istraživački zadaci: 1. Tretman grupe od 30 krava injekcionim preparatom  
25 vitamina C supkutano i kontrolne grupe od 10 krava, na isti način i u istoj količini, sterilnim  
26 fiziološkim rastvorom. 2 Ispitivanje hematološkog profila svih krava uključenih u ogled na  
27 početku i na kraju terapije. 3. Mikrobiološka analiza uzoraka mleka i određivanje broja  
28 somatskih ćelija u mleku svih grla uključenih u ogled, na početku i na kraju terapije 4.  
29 Ispitivanje funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita (intenzitet fagocitoze i respiratorni  
30 prasak) krava tretirane i kontrolne grupe u krvi i mleku, na početku i na kraju terapije..

31  
32 Poglavlje **Materijal i metode** je napisano na 16 strana i podeljeno u pet podpoglavlja: 1.  
33 Ogledne životinje, 2. Faze eksperimenta, 3. Uzorkovanje materijala za istraživanja u  
34 laboratoriji, 4. Rad u laboratoriji i 5. Statistička obrada rezultata.

35  
36 Istraživanja su vršena na komercijalnoj farmi visoko-mlečnih krava holštajn-frizijske rase u  
37 okolini Beograda, sa oko 1000 krava na muži, u vezanom sistemu držanja uz dvokratnu mužu  
38 u samom objektu. Prosečna mlečnost na farmi je iznosila oko 8.000 L (305 dana). Ishrana je  
39 bila zasnovana na dvokratno dostavljanom kompletno izmešanom obroku.

40  
41 Higijena vimena je sprovedena suvim pranjem oksipenom pre muže i potapanjem papila u  
42 rastvor Blu-gard (Ecolab Inc., USA) posle muže, na bazi dodecil-benzensulfonske kiseline.  
43 Muža je vršena dvokratno aparatima "DeLaval" sa individualno programiranom kontrolom  
44 muže. Dezinfekcija muznih aparata i sistema za mužu obavljena je svakodnevno, prema  
45 instrukcijama proizvođača.

46  
47 Za izvođenje eksperimenta je odabrano ukupno 40 krava holštajn-frizijske rase, sličnog  
48 pariteta i starosti. Selekcija grla je obavljena na osnovu sledećih kriterijuma: da je od teljenja  
49 prošlo najmanje 10, a najviše 30 dana; da su na jutarnjoj muži krave imale pozitivnu reakciju  
50 na CMT (odabrana su samo grla sa ++ i +++ pozitivnom reakcijom) u jednoj ili više četvrti,  
51 bez klinički vidljivog mastitisa; da je teljenje prošlo normalno, bez dodatne asistencije i da su  
52 krave bile klinički zdrave. Krave su bile podeljene u dve grupe: 1. Tretirana grupa, (n=30) koja  
53 je supkutano dobijala injekcioni preparat vitamin C („Vitamin C“, VZ Subotica, R. Srbija) po  
54 završetku jutarnje muže, jednom dnevno, u periodu od 5 uzastopnih dana, u isto vreme, na  
55 isti način i u istoj ukupnoj količini (po 125 ml); 2. Kontrolna grupa, (n=10), koja je supkutano  
56 dobijala sterilni fiziološki rastvor (*Sol. Natrii chloridi infundibile* 0.9%, Hemofarm AD, Vršac, R.  
57 Srbija) u istoj količini i na isti način kao i grla ogledne grupe.

58  
59 Trijaža grla za uključivanje u eksperiment je vršena na osnovu CMT testa na jutarnjoj muži.  
60 Od grla koja su pozitivno reagovala (++, +++) odmah su uzimani uzorci mleka na propisan

1 način iz svake četvrti sa pozitivnom reakcijom, pojedinačno u sterilne epruvete radi dalje  
2 mikrobiološke analize (bakteriološka izolacija i tipizacija) i određivanja broja somatskih ćelija.  
3 Nakon obavljene jutarnje muže, vršeno je uzorkovanje (na istovetan način kod svih 40 grla  
4 uključenih u eksperiment) i to: a. pune krvi iz *v. jugularis* (kvantitativno-kvalitativni test  
5 fagocitne sposobnosti i respiratornog praska PMNL i monocita), u vakutejner sa heparinom,  
6 b. uzorka mleka iz CMT pozitivnih četvrti (u slučaju dve ili više četvrti uziman je zbirni uzorak iz  
7 tih četvrti za kvantitativno-kvalitativni test fagocitne sposobnosti i respiratornog praska PMNL i  
8 monocita), pred sam početak muže, nakon odbačenih prvih par mlazeva mleka i c. drugog  
9 uzorka pune krvi iz *v. jugularis* (hematološka analiza sa diferencijalnom leukocitarnom  
10 formulom) kada su korišćeni vakutajneri sa EDTA, neposredno nakon obavljene muže. Zatim  
11 je sprovedena terapija jedinki tretirane grupe, injekcionim preparatom vitamina C u trajanju od  
12 5 dana, odmah po završenoj jutarnjoj muži dok je na isti način kontrolna grupa primala  
13 fiziološki rastvor. Poslednjeg dana eksperimenta je vršeno drugo uzorkovanje i to: a. pune  
14 krvi iz *v. jugularis* (za kvantitativno-kvalitativni test fagocitne sposobnosti i respiratornog  
15 praska PMNL i monocita) uz korišćene vakutajnera sa heparinom, neposredno nakon muže;  
16 b. uzorka mleka iz CMT pozitivnih četvrti (u slučaju dve ili više četvrti uziman je zbirni uzorak  
17 iz tih četvrti za kvantitativno-kvalitativni test fagocitne sposobnosti i respiratornog praska  
18 PMNL i monocita), pred sam početak muže, nakon odbačenih nekoliko prvih par mlazeva  
19 mleka; c. drugog uzorka pune krvi iz *v. jugularis* (za hematološke analize) kad je korišćen  
20 vakutejner sa EDTA, neposredno nakon obavljene muže i d. uzorka mleka iz svake četvrti  
21 koji su na CMT testu ispoljila pozitivnu reakciju sa samog početka (prvog dana) eksperimenta,  
22 pojedinačno u sterilne epruvete za dalju mikrobiološku analizu i određivanje broja somatskih  
23 ćelija.

24  
25 Vitamin C ("Vitamin C", VZ Subotica, R. Srbija), je aplikovan jednom dnevno, potkožno u  
26 preskapularnoj regiji na više mesta u trajanju od 5 uzastopnih dana i to isključivo posle  
27 jutarnje muže. Ovaj injekcioni preparat vitamina C sadrži 100 mg askorbinske kiseline/mL  
28 rastvora, u bočicama od 50 mL. Jednokratna dnevna doza po grlu je bila u proseku 25 mg/kg  
29 telesne mase, odnosno, ukupno 125 mL preparata jednom dnevno tokom 5 terapijskih dana.  
30 Za aplikaciju su korišćene sterilne plastične brizgalice od 50 mL i igle 18G, (Kruuse, Danska).  
31 Venepunkcijom (*v. jugularis*) su uzimana po dva uzorka pune krvi od svih grla uključenih u  
32 ogleđ u isto vreme, dva puta tokom trajanja eksperimenta. Prvo uzorkovanje je obavljano  
33 pred sam početak terapije, a drugo, na isti način, po njenom završetku.

34  
35 Uzorak za analizu krvne slike je uziman u vakutajnere sa EDTA zapremine 5 ml (Kruuse,  
36 Denmark), a drugi uzorak, namenjen za analizu fagocitne sposobnosti i respiratornog praska  
37 PMNL i monocita, je uziman u vakutajnere zapremine 6 ml sa 102 IJ Litijum-heparina  
38 (BDVacutainer®, Plymouth, Velika Britanija). Uzorci su zatim "na hladnom" transportovani do  
39 laboratorije gde su vršene analize u narednih 4 do 8 sati

40  
41 Uzorkovanje mleka za mikrobiološku analizu je vršeno posle dezinfikovanja papile vimena  
42 70% alkoholom prema proceduri Nacionalnog Saveta za Mastitis (NMC – The National  
43 Mastitis Council; Anon, 2001) tako da se mogućnost kontaminacije mleka svodi na minimum.  
44 Na osnovu rezultata CMT testa, uzorkovano je mleko samo od grla koja su pozitivno  
45 reagovala (++, +++) i iz svake pozitivne četvrti pojedinačno u sterilne epruvete. Na kraju  
46 ogleđ je mleko uzorkovano drugi put, iz istih četvrti, na isti način i u isto vreme.

47  
48 Uzorkovanje mleka za utvrđivanje fagocitne sposobnosti i respiratornog praska je obavljano  
49 pred početak muže (2 x 50 mL mleka iz CMT ++, +++) pozitivnih četvrti sa početka ogleđ i to  
50 dva puta tokom ogleđ (na početku o po okončanju terapije). Mleko je uzimano nakon  
51 odbačenih prvih par mlazeva iz CMT pozitivnih četvrti utvrđenih prvog dana eksperimenta. U  
52 slučajevima u kojim je bilo dve ili više pozitivnih četvrti uziman je zbirni uzorak.

53  
54 Uzorci su dopremani do laboratorije i bili obrađeni u roku od 4 do 8 sati nakon muže. Tokom  
55 transporta u frižider – torbi, temperatura uzoraka nije prelazila 10°C.

56  
57 Laboratorijske analize su vršene u dve laboratorije: VetLab Beograd (mikrobiološka analiza  
58 uzoraka mleka sa antibiogramom i hematološka analiza uzoraka pune krvi sa leukocitarnom  
59 formulom) i Laboratoriji Odelenja za reprodukciju Naučnog instituta za veterinarstvo "Novi

1 Sad", (kvantitativno-kvalitativni test fagocitne sposobnosti i respiratornog praska neutrofilnih  
2 granulocita i monocita iz uzoraka pune krvi i mleka).

3  
4 Mikrobiološke analize su izvođene tako da su uzorci mleka nakon centrifugiranja i odlivanja  
5 supernatanta zasejavani na hranljive podloge: Columbia agar sa dodatkom 5% ovčije krvi  
6 (Biomeriux, Francuska), MacConkey agar (Biomeriux, Francuska) i Sabouraud dekstrozni  
7 agar (Biomeriux, Francuska). Petrijeve ploče sa zasejanim uzorcima mleka su inkubirane 72  
8 časa u aerobnoj sredini na 37° C odnosno na 25° C (Sabouraud dekstrozni agar), a rast  
9 bakterijskih kolonija je proveravan svakodnevno. Nakon inkubacije, izolovane kolonije  
10 bakterija su presejavane radi dobijanja čistih kultura na Columbia agar sa dodatkom 5%  
11 ovčije krvi (Biomeriux, Francuska) i hranljivi agar (Himedia) dok su izolovane gljivice  
12 presejavane na Sabouraud dekstrozni agar. Identifikacija izolovanih bakterija i gljivica je  
13 izvedena na osnovu njihovih kulturelnih osobina, testova katalaze, oksidaze i biohemijskih  
14 osobina.

15  
16 Vrste iz roda *Staphylococcus* su identifikovane na osnovu kulturelnih osobina (izgled kolonija i  
17 hemoliza na agaru sa dodatkom ovčije krvi), mikroskopskog pregleda nakon bojenja po  
18 Gramu, pozitivnog rezultata u katalaza testu, negativnog rezultata u oksidaza testu, rezultata  
19 u testu koagulacije plazme kunića (koagulaza test) u epruveti i na mikroskopskoj pločici  
20 (vezana koagulaza - *clumping factor*), testu produkcije acetoina i testu razlaganja maltoze na  
21 purpurnom agaru. Konačna identifikacija sojeva iz roda *Staphylococcus* izvršena je nakon  
22 očitavanja biohemijskih reakcija u bateriji biohemijskih testova ID 32 Staph (Biomerieux,  
23 France).

24  
25 Vrste iz roda *Streptococcus* su identifikovane na osnovu kulturelnih osobina (izgled kolonija i  
26 hemoliza na agaru sa dodatkom ovčije krvi), mikroskopskog pregleda nakon bojenja po  
27 Gramu, negativnog rezultata u katalaza i oksidaza testu, negativnom testu rasta u bujonu sa  
28 6% natrijum hlorida, rezultatima u CAMP testu, hipurat testu, bacitracin testu i testu hidrolize  
29 eskulina. Konačna identifikacija sojeva iz roda *Streptococcus* izvršena je nakon očitavanja  
30 rezultata aglutinacije sa serumima specifičnim za grupe streptokoka po Lancefield-ovoj i  
31 očitavanja biohemijskih reakcija u bateriji biohemijskih testova rapid ID 32 Strep (Biomerieux,  
32 France).

33  
34 Patogene gljivice su identifikovane nakon rasta na Sabouraud dekstroznom agaru, kulturelnih  
35 osobina i rasta na Chrom ID Candida agaru (Biomerieux, France).

36  
37 Broj somatskih ćelija (SCC) u mleku je određivan aparatom Fossomatic FC (Foss Analytical,  
38 Danska) koji radi na principu protočne citometrije. U skladu sa tehničkom specifikacijom,  
39 maksimalan broj obrađenih uzoraka po radnom satu je 400, a opseg merenja 1 – 1,5 milion  
40 SCC.

41  
42 Analize kompletne krvne slike su izvedene hematološkim analizatorom Hemavet 950 FS  
43 (Drew Scientific, SAD) najkasnije do 6 sati od uzorkovanja. Analizirane su bela krvna loza,  
44 diferencijalna leukocitarna formula, crvena krvna loza kao i broj trombocita. Analize su kod  
45 svih grla rađene na početku i na kraju oglada

46  
47 Kvantitativno određivanje fagocitne sposobnosti leukocita iz uzoraka heparinizovane pune  
48 krvi krava vršeno je komercijalnim kitom „PHAGOTEST® (Glykotype Biotechnology GmbH,  
49 Heidelberg, Germany). Kao fagocitne čestice su korišćene fluoresceinom (FITC - fluorescein  
50 – izo – tio - cijanat) obeležene, opsonizovane bakterije *E. coli*. Određivan je procenat  
51 monocita i granulocita koji su izvršili fagocitozu (jedne ili više bakterija), kao i fagocitna  
52 sposobnost pojedinačnih ćelija (broj fagocitovanih bakterija po ćeliji).

53  
54 Kvantitativno određivanje proizvoda oksidativnog (respiratornog) praska iz uzoraka pune  
55 heparinizovane krvi krava, vršeno je komercijalnim testom „PHAGOBURST® (Glykotype  
56 Biotechnology GmbH, Heidelberg, Germany). Test sadrži neobeležene opsonizovane  
57 bakterije *E. coli*, forbol 12-miristat 13-acetat (PMA) i hemotaksični peptid N-formil-Metil-Leucil-  
58 Fenil (fMLP) kao stimulator oksidativnog praska. Hemotaktički peptid, fMLP je slab fiziološki  
59 stimulator oksidativnog praska, *E. coli* je čestični stimulator praska i smatra se umerenim  
60 stimulatorom, dok je ligand protein kinaze C (PMA) snažan stimulator.

1  
2 Čelije su analizirane na uređaju za protočnu citometriju Guava Easy Cyte (Guava  
3 Technologies, Hayward, California, SAD). U svim uzorcima je analizirano najmanje 10.000  
4 čestica.

5  
6 Kvalitet (jačina) respiratornog praska pojedinačnih ćelija u Fagoburst testu, odnosno, broju  
7 fagocitovanih bakterija u Fagotestu izražavana je preko srednje vrednosti pozitivnih reakcija,  
8 odnosno, srednjeg intenziteta fluorescence (engl. *mean fluorescence intensity*-MFI).

9  
10 Statistička obrada rezultata je vršena određivanjem deskriptivnih statističkih parametara:  
11 aritmetičke sredine ( $\bar{x}$ ), standardne devijacije (SD), standardne greške ( $S_x$ ), koeficijenta  
12 varijacije (CV %) i intervala varijacije (IV). Statističke značajnosti izračunate su jednostranom  
13 ANOVA (analizom varijanse) i Studentovim testom (*t*-test). Vrednosti za  $p < 0,05$  smatrane su  
14 značajnim. Ove analize su vršene primenom PC programskog paketa Edustat 2.04. (R.  
15 Srbija) i Statistica 8 (Stat Soft, Inc., Tula, SAD). Dobijeni rezultati su prikazani tabelarno i u  
16 vidu dijagrama.

17  
18 Poglavlje **Rezultati istraživanja** je napisano na 25 strana teksta i sadrži 35 tabela.

19  
20 Radi bolje preglednosti, rezultati su, u skladu sa postavljenim istraživačkim ciljem i zadacima,  
21 prikazani u sledeća četiri podpoglavlja: 1. Rezultati CMT testa, mikrobiološke analize mleka i  
22 broja somatskih ćelija u kontrolnoj i oglednoj grupi pre i nakon terapije vitaminom C; 2.  
23 Rezultati ispitivanja hematološkog profila nakon terapije vitaminom C; 3. Rezultati ispitivanja  
24 funkcionalne aktivnosti polimorfonuklearnih leukocita i monocita krvi krava nakon terapije  
25 vitaminom C i 4. Rezultati ispitivanja funkcionalne aktivnosti polimorfonuklearnih leukocita i  
26 monocita iz mleka krava nakon terapije vitaminom C.

27  
28 Ukupno je analizirano 30 uzoraka, poreklom od grla tretiranih vitaminom C i 10 uzoraka od  
29 kontrolnih plotkinja (bez tretmana). Uzorci su prikupljeni pre i nakon petodnevnog tretmana.  
30 Prosečan broj laktacija analizirane grupe plotkinja je iznosio  $2,17 \pm 1,96$ . Od toga je 9 grla (15  
31 %), bilo sa 4 i više laktacija, što govori da je analizirana grupa krava bila relativno mlada i u  
32 proseku na početku druge laktacije.

33  
34 Prvo uzorkovanje mleka i krvi radi određivanja CMT testa i bakterioloških pretraga mleka,  
35 hematološkog profila i ispitivanja funkcije PMNL i monocita izvršeno je  $23,14 \pm 3,85$ . dana  
36 nakon teljenja, dok je ponovljeno uzorkovanje izvršeno 7 dana kasnije, odnosno, prosečno sa  
37  $30,14 \pm 3,85$  dana laktacije.

## 38 39 **1. Rezultati CM testa, mikrobiološke analize mleka i broja somatskih ćelija u tretiranoj i** 40 **oglednoj grupi**

### 41 42 1.1. Rezultati CM testa

43  
44 Rezultati ovih ispitivanja su nedvosmisleno ukazali da je kod ogledne grupe došlo do veoma  
45 značajnog poboljšanja rezultata CMT testa nakon završene terapije vitaminom C. Izlečenje je  
46 postignuto kod 25 (negativan CMT rezultat) od ukupno 37 četvrti, odnosno u 67,57 % slučajeva.  
47 U kontrolnoj grupi krava rezultati su ostali slični na početku i na kraju oglada.

### 48 49 1.2. Rezultati mikrobiološkog ispitivanja uzoraka mleka

50  
51 U mleku krava sa supkliničkim mastitisom, tretiranih visokim dozama vitamina C, došlo je do  
52 smanjenja broja bakterijskih kolonija za 40,35 % dok je u oglednoj grupi ovo smanjenje iznosilo  
53 31,70 %. Ukupan broj bakterijskih izolata je takođe bio smanjen u tretiranoj grupi krava za  
54 razliku od kontrolne grupe (75 : 66 i 34 : 33). U obe grupe krava dominantni izolati su bili  
55 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* i *Prototheca* kao i apatogeni sojevi iz roda  
56 *Micrococcus* i *Bacillus*. Injekciona aplikacija visokih doza vitamina C u ovom eksperimentu je  
57 imala relativno mali efekat na eliminaciju patogenih mikroorganizama iz vimena.

58  
59 Međutim, primetna je pojava smanjenja ukupnog broja bakterija po mililitru mleka (CFU/ml)  
60 nakon aplikacije injekcionog vitamina C. Analizom broja bakterijskih kolonija ukazuje da postoji

1 smanjenje broja CFU/mL uz razumno visoke koeficijente varijacije bez statističke značajnosti  
2 razlika u srednjim vrednostima. Terapija C vitaminom bila je delotvorna u 52,8% slučajeva (od  
3 36 tretiranih četvrti kod 19 je detektovano manje od 400.000 CFU/ml), od čega je ekstra klasi  
4 mleka pripadalo 41,67% uzoraka (15/36 četvrti sa manje od 100.000 CFU/ml).

### 6 1.3. Rezultati određivanja broja somatskih ćelija

8 Analizom broja somatskih ćelija u mleku nakon tretmana vitaminom C, uz visoke koeficijente  
9 varijacije može se uočiti značajan pad njihovog broja. Ukoliko se izvrši analiza grla na osnovu  
10 kliničkog izlečenja (izostanak pozitivnih reakcija na CMT; broj somatskih ćelija u vrednostima  
11 oko i ispod 500.000 ćelija/mL mleka), izlečenje je utvrđeno kod 66,67 % slučajeva (24/36  
12 četvrti). U kontrolnoj grupi, od 12 četvrti spontano je došlo do smanjenja broja ćelija samo u  
13 jednom slučaju 8,33 %.

## 15 2. Rezultati ispitivanja hematološkog profila nakon terapije vitaminom C

17 Rezultati postignuti u okviru ovog istraživačkog zadatka su prikazani kao: 1. rezultati  
18 određivanja bele krvne slike i leukocitarne formule, 2. rezultati određivanja crvene krvne slike i  
19 3. rezultati određivanja broja trombocita u zavisnosti, od terapije vitaminom C.

### 21 2.1. Bela krvna slika u kontrolnoj grupi i grupi krava tretiranih vitaminom C

23 Srednje vrednosti za broj elemenata bele krvne loze neposredno nakon terapije ispoljavaju  
24 tendencu blagog pada, nakon petodnevne aplikacije preparata vitamina C. U krvi kontrolne  
25 grupe krava se uočava blag porast kod svih analiziranih parametara bele krvne slike (osim  
26 eozinofilnih granulocita). Primetne su visoke oscilacije u vrednostima većine analiziranih  
27 parametara.

28 Dobijeni rezultati ukazuju da nije došlo do promena u beloј krvnoj slici krava pre i nakon terapije  
29 vitaminom C. U kontrolnoj grupi plotkinja je bela krvna slika na početku i kraju ogleđa ostala  
30 nepromenjena ( $p > 0,05$ ).

31 Usled visokih oscilacija u vrednostima za ukupan broj limfocita, monocita, eozinofilnih i  
32 bazofilnih granulocita, ne postoji statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima, niti  
33 konkretan efekata na parametre bele krvne slike nakon terapije vitaminom C. Sve analizirane  
34 vrednosti parametara bele krvne slike su bile u fiziološkim granicama.

35 U kontrolnoj grupi krava, na kraju ogleđa, nisu zapažena veća odstupanja u srednjim  
36 vrednostima procentualnog udela PMNL, limfocita, monocita, eozinofilnih i bazofilnih  
37 granulocita u krvi. Ove vrednosti su bile gotovo identične onima na početku ogleđa.

38 Analizom dobijenih podataka nisu ustanovljene statističke značajnosti razlika u  
39 procentualnom udelu elemenata bele krvne loze između krava tretiranih preparatom vitamina  
40 C i kontrolnih jedinki u odnosu na početak i kraj tretmana ( $p > 0,05$ ). Međutim, bilo je  
41 evidentno da je narušen fiziološki odnos udela PMNL prema limfocitima, čija srednja vrednost  
42 za fiziološke granice iznose 56 % : 32 % u korist limfocita. Kod ogleđne i kontrolne grupe  
43 krava ovaj odnos je bio obrnut usled povećane proizvodnje PMNL i istovremenog kretanja  
44 ćelija ka mlečnoј žlezdi ili drugim mestima upale u ranoј fazi laktacije. U krvi je bio niži i  
45 apsolutni broj limfocita. Ovi nalazi ukazuju da se verovatno radilo o subakutnoj, latentnoj  
46 infekciji mlečne žlezde. Slični hematološki nalazi postoje i pri upali materice u ranoј fazi nakon  
47 teljenja.

### 49 2.2. Crvena krvna slika krava u kontrolnoj grupi i grupi krava tretiranih vitaminom C

51 Većina vrednosti parametara crvene krvne slike je bila na donjim fiziološkim vrednostima, što  
52 se pogotovo odnosilo na broj eritrocita ( $5,77 \pm 0,98$  i  $5,69 \pm 0,72$  za ogleđnu i kontrolnu grupu;  
53 fiziološka granica -  $5-10 \times 10^{12}/L$ ); koncentraciju hemoglobina ( $82,4 \pm 12,9$  g/L i  $82,6 \pm 12,2$  g/L  
54 za ogleđnu i kontrolnu grupu; fiziološka granica - 80-150 g/L) i za hematokrit ( $25,52 \pm 2,98$  % i  
55  $24,79 \pm 3,07$  % za ogleđnu i kontrolnu grupu; fiziološka granica – 24 - 46%). Istovremeno,  
56 oscilacije unutar ispitivanih parametara su bile veoma male (koeficijent varijacije do 16 %)

57 Primenom t-testa nisu dokazane statističke značajnosti u srednjim vrednostima za parametar  
58 crvene krvne slike krava pre i nakon tretmana vitaminom C, kao ni u kontrolnoj grupi na  
59 početku i na kraju ogleđa. Jedina značajnost razlika je ustanovljena na nivou RDW parametra  
60 (distribucija različitih veličina eritrocita;  $p < 0,05$ ) u ogleđnoj grupi.

1  
2 **2.3. Trombociti i prosečna zapremina trombocita u kontrolnoj grupi i grupi krava tretiranih**  
3 **preparatom vitamina C**  
4

5 Vrednosti za broj trombocita su bile u fiziološkim granicama na početku i na kraju tretmana, uz  
6 umerene oscilacije. U ogleđnoj grupi je došlo do pada vrednosti (sa  $413,97 \pm 103,01$  na  
7  $381,93 \pm 114,94 \times 10^9/L$ ), dok je u kontrolnoj došlo do porasta (sa  $331,60 \pm 119,62$  na  $358,00 \pm$   
8  $157,42 \times 10^9/L$ ). Primenom *t*-testa nezavisnih uzoraka nisu dokazane statističke značajnosti  
9 razlika u srednjim vrednostima broja trombocita i prosečnim vrednostima zapremine  
10 trombocita kod krava pre i nakon tretmana. Slični rezultati dobijeni su, na početku i na kraju  
11 ogleđa, i u kontrolnoj grupi.  
12

13 **3. Rezultati ispitivanja fagocitne sposobnosti i respiratornog praska PMNL i monocita iz**  
14 **krvi krava nakon primene terapije sa vitaminom C**  
15

16 **3.1. Rezultati ispitivanja fagocitne sposobnosti PMNL krvi krava nakon primene terapije**  
17 **vitaminom C:**  
18

19 Analizom dobijenih rezultata se može uočiti značajan porast fagocitne aktivnosti PMNL krvi  
20 nakon tretmana vitaminom C u pogledu procenta aktiviranih ćelija sa  $83,43 \pm 7,47$  % na  $90,04 \pm$   
21  $7,26$  % ( $p < 0,001$ ), uz mali koeficijent varijacije analiziranog parametra ( $8,95$  % i  $7,26$  %).  
22 Nasuprot ovom nalazu, vrednosti fagocitne aktivnosti PMNL krvi u kontrolnoj grupi krava su  
23 ostale gotovo identične na početku i na kraju ogleđa ( $90,88 \pm 3,46$  % i  $90,31 \pm 2,32$  %).  
24 Prosečan indeks fluorescencije (MFI) je značajno porastao sa  $471,73 \pm 123,41$  na  $615,65 \pm$   
25  $218,24$  dok vrednosti u kontrolnoj grupi, nasuprot tome, beleže pad. Srednje vrednosti procenta  
26 PMNL krvi koji su izvršili fagocitocitozu kao i prosečan intenzitet njihove fluorescence (MFI, kao  
27 indikator intenziteta fagocitoze) nakon tretmana vitaminom C su kod ogleđne grupe statistički je  
28 veoma značajno više ( $p < 0,001$ ) u poređenju sa vrednostima na početku tretmana. Terapija  
29 vitaminom C istovremeno je ispoljila pozitivan i visoko značajan uticaj na fagocitozu PMNL krvi  
30 ( $p < 0,001$ ). Posebno se ističe intenzitet fagocitoze PMNL krvi na kraju ogleđa u odnosu na isti  
31 parametar kontrolne grupe. U kontrolnoj grupi nije došlo do statistički značajnih promena  
32 razlika u srednjim vrednostima ovih parametara poredeći vrednosti na početku i kraju ogleđa.  
33

34 **3.2. Rezultati ispitivanja fagocitne sposobnosti monocita krvi krava nakon primene terapije**  
35 **vitaminom C:**  
36

37 Slično kao kod PMNL iz krvi, srednje vrednosti procenta aktivnih monocita iz krvi u procesu  
38 fagocitoze kao i intenzitet njihove fagocitoze nakon tretmana vitaminom C pokazuju statistički  
39 visoko značajan stepen aktivacije ( $p < 0,001$ ) u odnosu na kontrolnu grupu gde su razlike bile  
40 samo numeričke ( $p > 0,05$ ).  
41 U odnosu na PMNL krvi gde je fagocitoza zabeležena kod oko 90 % ćelija, aktivnost monocita  
42 se kretala oko 30 %, uz višestruko slabiji intenzitet fluorescencije kao indikatora snage ROS  
43 (engl. *reactive oxygen species*) reakcije.  
44

45 **3.3. Rezultati ispitivanja respiratornog praska PMNL krvi krava nakon primene terapije**  
46 **vitaminom C:**  
47

48 Utvrđena je statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima procenta PMLN u punoj krvi  
49 koji su izvršili respiratorni prasak u grupi tretiranoj C vitaminom ( $p < 0,05$ ). Ovaj porast kreće se  
50 od  $38,62 \pm 16,58$  % pre tretmana do  $49,00 \pm 18,83$  % nakon tretmana.  
51 U kontrolnoj grupi nije ustanovljena statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima na  
52 početku i na kraju ogleđa ( $p > 0,05$ ) i čak je zabeležen umeren pad procenta ROS aktiviranih  
53 PMNL.  
54 Za razliku od fagocitne aktivnosti PMNL krvi koja je bila na visokom nivou (oko 90 % aktiviranih  
55 ćelija), procenat ROS aktivnih ćelija je znatno niži i kretao se od 32-49 %. U prosečnom  
56 intenzitetu fluorescence (MFI) PMNL krvi, nakon fagocitoze, nije utvrđena statistička značajnost  
57 ni kod ogleđne ni u kontrolnoj grupi  
58

59 **3.4. Rezultati ispitivanja respiratornog praska monocita krvi krava nakon primene terapije**  
60 **vitaminom C:**

1  
2 U ogleđnoj i kontrolnoj grupi došlo je do pada procenta monocita krvi koji su izvršili respiratorni  
3 prasak (sa  $17,96 \pm 13,83$  % na  $13,59 \pm 10,76$  %, odnosno sa  $15,90 \pm 6,04$  % na  $9,12 \pm 6,04$   
4 %), s tim da je ova razlika bila statistički značajna u kontrolnoj grupi ( $p < 0,05$ ), ali ne i u  
5 tretiranoj. Slično negativnom trendu u procentu ROS aktiviranih monocita krvi, dokazan je  
6 statistički značajan pad prosečnog intenziteta fluorescencije (MFI) monocita krvi kod tretirane i  
7 kontrolne grupe ( $p < 0,05$ ). Dobijene vrednosti za reakciju respiratornog praska monocita krvi su  
8 višestruko niže u odnosu na vrednosti respiratornog praska PMNL krvi.  
9

#### 10 **4. Rezultati ispitivanja funkcionalne aktivnosti polimorfonuklearnih leukocita i monocita** 11 **mleka krava nakon terapije vitaminom C**

##### 12 13 *4.1. Rezultati ispitivanja fagocitne sposobnosti PMNL mleka krava nakon primene terapije sa* 14 *vitaminom C:*

15  
16 Dokazana je statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima ( $p < 0,05$ ) za fagocitnu  
17 aktivnost i intenzitet fagocitoze PMNL (MFI) u uzorcima mleka poreklom od krava tretirane  
18 grupe. Ove vrednosti su bile veoma niske, sa velikim individualnim varijacijama. U 9 od 30  
19 uzoraka iz ogleđne grupe (30%) fagocitna aktivnost je potpuno izostala što je dokazano  
20 protočnom citometrijom. Ovo nije zapaženo analizom aktivnosti PMNL iz mleka krava  
21 kontrolne grupe, ali su vrednosti takođe bile vrlo niske.  
22

##### 23 *4.2. Rezultati ispitivanja fagocitne sposobnosti monocita mleka krava nakon primene* 24 *terapije vitaminom C*

25  
26 Fagocitna sposobnost monocita mleka je bila izrazito slaba, odnosno i izostala je kod 90%  
27 (27/30) uzoraka ogleđne grupe. Kod preostalih 10% uzoraka (3/30) bila je manja od 1%.  
28 Ukupan nivo fagocitoze monocita iz mleka je zabeležen kod 0,03% ćelija na početku ogleđna i  
29 0,11% ćelija na kraju ogleđna, posle tretmana vitaminom C. Slični nalazi su dobijeni i u  
30 kontrolnoj grupi.  
31

##### 32 *4.3. Rezultati ispitivanja respiratornog praska PMNL mleka krava nakon primene terapije* 33 *vitaminom C*

34  
35 Nasuprot procesu fagocitoze, proces stvaranja reaktivnih oksida u PMNL mleka nije bio  
36 ometen jer se verovatno radilo o rezultatu jedinstvenog procesa ćelijske smrti (*neutrophil*  
37 *extracellular traps*, NETs) koji se odlikuje pozitivnom ROS reakcijom (pre svega kod PMNL),  
38 uz slabu detekciju procesa fagocitoze metodom protočne citometrije.

39 Nisu utvrđene statističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima procenta PMNL mleka koji  
40 su reagovali respiratornim praskom između ogleđne i kontrolne grupe ( $p > 0,05$ ). Kod obe grupe  
41 krava je zapaženo povećanje procenta ćelija koje su pozitivno reagovala, ali ono nije bilo  
42 statistički značajno usled visokog stepena varijacija.

43 Kao i u prethodnom slučaju, nisu utvrđene statističke značajnosti razlika u srednjim  
44 vrednostima za intenzitet respiratornog praska (MFI) između tretirane i kontrolne grupe ( $p >$   
45  $0,05$ ). Registrovan je porast vrednosti u tretiranoj i kontrolnoj grupi na kraju tretmana, ali  
46 promene ispoljavaju visok stepen oscilacija u vrednostima. One su imale tendencu rasta na  
47 kraju ogleđna, odnosno, na kraju tretmana vitaminom C. Razlike su bile samo numeričke, bez  
48 statističke značajnosti ( $p > 0,05$ ).

49 Za razliku od PMNL mleka, monociti ispoljavaju dvostruku manju aktivnost ćelija u ROS reakciji  
50 (kontrolna grupa PMNL imala je 73,62% ROS aktiviranih ćelija, dok je ova vrednost kod  
51 monocita bila 36,26% na kraju tretmana vitaminom C).

52 Nije bilo statističke značajnosti u srednjim vrednostima intenziteta respiratornog praska (MFI)  
53 monocita mleka ( $p > 0,05$ ) poreklom od krava tretirane i kontrolne grupe. Razlike su bile samo  
54 numeričke, u korist vrednosti registrovanih na kraju ogleđna.  
55

56 Poglavlje **Diskusija** je napisano na 24 strane i sadrži 20 grafikona i 2 tabele. U njemu je  
57 kandidat detaljno analizirao ustanovljene razlike između tretirane i kontrolne grupe krava i  
58 uporedio svoje rezultate sa nalazima drugih autora.  
59



1 U poglavlju **Zaključci**, kandidat je jasno i koncizno formulisao osnovne nalaze svojih  
2 istraživanja u vidu deset zaključaka. Poglavlje **Popis literature** je napisano na 53 strane i  
3 sadrži 872 reference, uglavnom novijeg datuma, velikim delom iz vodećih međunarodnih  
4 časopisa.

5  
6 VI ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA (navesti zaključke koji su prikazani u doktorskoj disertaciji):  
7 Na osnovu rezultata, dobijenih istraživanjima u okviru ove doktorske disertacije, kandidat je  
8 formulisao sledeće zaključke:

9  
10 1. Posle 5-dnevne aplikacije visokih doza vitamina C došlo je do smanjenja ili izostanka  
11 CMT (California Mastitis Test) pozitivne reakcije u mleku poreklom iz 70% četvrti tretiranih  
12 krava u fazi rane laktacije.

13  
14 2. U mleku krava sa supkliničkim mastitisom, tretiranih visokim dozama vitamina C, došlo je  
15 do smanjenja broja bakterijskih kolonija za 40,35 % dok je u ogleđnoj grupi ovo smanjenje  
16 iznosilo 31,70 %. Ukupan broj bakterijskih izolata je takođe bio smanjen u tretiranoj grupi  
17 krava za razliku od kontrolne grupe (75 : 66 i 34 : 33). U obe grupe krava dominantni izolati  
18 su bili *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* i *Prototheca* kao i apatogeni  
19 sojevi iz roda *Micrococcus* i *Bacillus*.

20  
21 3. Broj somatskih ćelija u mleku je nakon tretmana vitaminom C, bio značajno smanjen  
22 ( $p < 0,05$ ). Izlečenje je utvrđeno u 66,67 % slučajeva (24/36 četvrti). U kontrolnoj grupi je  
23 od 12 četvrti, spontano došlo do smanjenja broja ćelija samo u jednom slučaju (8,33 %).

24  
25 4. Tretman visokim dozama vitamina C nije uticao na broj eritrocita, koncentraciju  
26 hemoglobina, hematokritsku vrednost i izvedene parametre crvene krvne slike.

27  
28 5. Ukupan broj leukocita, broj polimorfonuklearnih leukocita i limfocita, kao i njihov odnos,  
29 nije se menjao u zavisnosti od tretmana vitaminom C. Kod grla u ranoj laktaciji sa  
30 pozitivnom CMT reakcijom u mleku, broj polimorfonuklearnih leukocita je bio povećan.

31  
32 6. Kod krava tretiranih subkutano C vitaminom registrovano je statistički visoko značajno  
33 povećanje procenta aktiviranih polimorfonuklearnih leukocita i monocita krvi ( $p < 0,001$ )  
34 uključenih u proces fagocitoze kao i veći intenzitet fagocitoze (MFI), što govori o snažnom  
35 stimulativnom dejstvu vitamina C na odbrambeni sistem. Stimulativni efekti su zabeleženi  
36 i kod polimorfonuklearnih leukocita mleka ali je fagocitoza bila niskog intenziteta ( $< 5$  %  
37 aktivnih ćelija;  $p < 0,05$ ).

38  
39 7. Procenat polimorfonuklearnih leukocita krvi koji su izvršili respiratorni prasak je bio  
40 statistički značajno viši ( $p < 0,05$ ) u grupi krava tretiranoj vitaminom C, dok je prosečan  
41 intenzitet njihove fluorescencije (MFI, kao indikator snage ROS reakcije) bio samo  
42 numerički viši i u krvi i u mleku.

43  
44 8. Fagocitna sposobnost polimorfonuklearnih leukocita i monocita je bila smanjena posle  
45 njihove migracije iz krvotoka u lumen mlečne žlezde, dok su intenzitet respiratornog  
46 praska i procenat aktiviranih ćelija bili slični kao kod polimorfonuklearnih leukocita krvi.

47  
48 9. Visoke doze vitamina C su smanjivale vrednosti respiratornog praska monocita u krvi,  
49 ali ove razlike nisu bile statistički značajne.

50  
51 10. Terapija supkliničkih mastitisa visokim dozama vitamina C može biti prihvatljiva  
52 alternantiva ili potpora antibiotskoj terapiji.

1 VII OCENA NAČINA PRIKAZA I TUMAČENJA REZULTATA ISTRAŽIVANJA (navesti da li su  
2 dobijeni rezultati u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima istraživanja, kao i da li zaključci  
3 proizilaze iz dobijenih rezultata):  
4

5 Dobijeni rezultati su u potpunosti u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima istraživanja, a  
6 izvedeni zaključci nedvosmisleno proizilaze iz rezultata sprovedenih istraživanja.  
7

8 VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:  
9

10 1. Da li je disertacija napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme? **DA**  
11

12  
13 2. Da li disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju? **DA**  
14

15  
16 3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?  
17

18 Doktorska disertacija Saše Mlinara, DVM, je bazirana na savremenom pristupu terapiji  
19 mastitisa visoko-mlečnih krava i sa stručne i naučne tačke gledišta otvara potpuno nove  
20 mogućnosti uspešnog lečenja ovog oboljenja. Imajući u vidu činjenicu da se radi o  
21 zdravstvenom poremećaju koji nanosi velike ekonomske štete mlečnoj industriji, primena  
22 dobijenih rezultata može doprineti poboljšanju zdravstvenog stanja visoko-mlečnih krava, uz  
23 značajno smanjenje upotrebe antibiotskih lekova, što je od posebnog značaja i za  
24 veterinarsku i za humanu medicinu zbog smanjivanja verovatnoće za nastanak rezistentnih  
25 bakterijskih sojeva.  
26

27 IX PREDLOG:  
28

29 Na osnovu ukupne ocene disertacije, komisija predlaže (odabrati jednu od tri ponuđenih  
30 mogućnosti):  
31

32 **- da se doktorska disertacija prihvati a kandidatu odobri odbrana**  
33

34 DATUM

23.02.2016.

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

MENTOR:

Dr Miodrag Lazarević, redovni profesor, FVM, Beograd  
39

40 \_\_\_\_\_  
41  
42 ČLANOVI KOMISIJE:

43  
44 Dr Slobodanka Vakanjac, vanredni profesor, FVM, Beograd  
45

46 \_\_\_\_\_  
47 Dr Aleksandar Milovanović, naučni saradnik, NIV "Novi Sad", Novi Sad  
48

49 \_\_\_\_\_  
50 Dr Aleksandar Stanojković, naučni saradnik, Institut za stočarstvo, Beograd  
51

52 \_\_\_\_\_  
53 Dr Igor Stojanov, viši naučni saradnik, NIV "Novi Sad", Novi Sad  
54  
55 \_\_\_\_\_