

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:

10 21. jun 2017. godine, 178. sednica Nastavno-naučnog veća Fakulteta veterinarske medicine
11 Univerziteta u Beogradu

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

- 16 • prof. dr Danijela Kirovski, redovni profesor, Fiziologija, 2016. godina, Fakultet
17 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
- 18
19 • prof. dr Miodrag Lazarević, redovni profesor, Fiziologija, 2002. godina, Fakultet
20 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
- 21
22 • doc. dr Ivan Vujanac, docent, Bolesti papkara, 2012. godina, Fakultet veterinarske
23 medicine Univerziteta u Beogradu
- 24
25 • prof. dr Ivan Jovanović, redovni profesor, Biohemija, 2011. godina, Fakultet
26 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
- 27
28 • dr Goran Korićanac, naučni savetnik, 2013. godina, Prirodno-matematičke nauke-
29 molekularna endokrinologija, Institut za nulearne nauke «Vinča» Univerziteta u
30 Beogradu

31
32 II PODACI O KANDIDATU:

33
34 1. Ime, ime jednog roditelja, prezime:

35 Ljubomir Dušan Jovanović

36 2. Datum rođenja, opština, Republika:

37 05.07.1987. Zaječar, Srbija

38 3. Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze*:

39 4. Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka*:

40 III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE: Uticaj peroralne aplikacije hroma na insulinsku
41 osovinu i IGF sistem kod teladi holštajn-frizijske rase

42
43 IV PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broja strana poglavlja, slika, šema,
44 grafikona i sl.): Doktorska disertacija kandidata Ljubomira Jovanovića napisana je na 90
45 strana i sadrži sledeća poglavlja: Uvod (2 strane), Pregled literature (15 strana), Cilj i zadaci
46 istraživanja (2 strane), Materijal i metode rada (13 strana), Rezultati istraživanja (23 strane),
47 Diskusija (13 strana), Zaključci (2 strane), Literatura (20 strana). Poslednje 4 strane su
48 biografija i izjave. Zahvalnica i kratak sadržaj na srpskom i engleskom jeziku nalazi se u prvih
49 5 strana. U disertaciji se nalazi 15 tabela (1 tabela u poglavlju Materijal i metode i 14 tabela u
50 poglavlju Rezultati) i 13 slika (3 slike u poglavlju Pregled literature i 10 u poglavlju Rezultati).

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

55 U Uvodu kandidat navodi da su ranija istraživanja ukazivala na povezanost
56 metabolizma insulina i hroma na način da deficit hroma dovodi do smanjene osetljivosti
57 perifernih tkiva na insulin. Takođe, navodi se da je utvrđen uticaj hroma na koncentraciju IGF-
58 I, ali da nisu rađena istraživanja o uticaju hroma na druge komponente IGF sistema (IGF-II,
59 IGF vezujuće proteine i receptore za IGF molekule). Na osnovu činjenice da se insulin, zbog

1 izvesnog afiniteta prema IGF receptorima, smatra komponentom IGF sistema, pretpostavlja
2 se da postoji izvesna interakcija hroma i IGF osovine. Ispitivanja interakcije metabolizma
3 insulina i hroma, u *in vivo* uslovima, najčešće se sprovode na molekularnom nivou, u
4 uzorcima mišićnog tkiva dobijenim biopsijom od jedinke kojoj je aplikovan hrom. Ovakva
5 ispitivanja su vršena kod ljudi i laboratorijskih životinja, ali ne i kod goveda kod kojih se, u
6 odnosu na monogastrične vrste, mogu očekivati izvesne razlike u dobijenim rezultatima, a s
7 obzirom na specifičnost metabolizma ugljenih hidrata. Od izuzetne je važnosti utvrditi mesto
8 interakcije hroma i elemenata insulinske osovine, jer se jedino sa tim saznanjem, može izvršiti
9 modulacija metabolizma dodavanjem ovog mikroelementa, a u cilju adekvatnog pospešivanja
10 rasta i razvoja jedinke. Kandidat u uvodu dodatno ukazuje na nedostatak literaturnih podataka
11 o mestu interakcije hroma sa metaboličkim putevima insulina i IGF-I i navodi da bi
12 molekularna ispitivanja na nivou mišićnog tkiva teladi kojima je peroralno aplikovan hrom
13 doprinela, ne samo tumačenju mehanizma delovanja hroma, već i saznanju o tome da li
14 dodavanje hroma kao suplementa u ishrani teladi može pozitivno da utiče na smanjenje
15 stresa izazvanog metaboličkim „prestrojavanjem“ prilikom zalučivanja teladi.

16
17 **Pregled literature** je podeljen u pet podpoglavlja. U prvom podpoglavlju kandidat
18 opisuje hemijske osobine hroma i istorijske podatke vezane za izučavanje hroma. U drugom
19 podpoglavlju kandidat nabraja hemijske forme hroma koje su do sada korišćene u
20 eksperimentima na ljudima i životinjama. Navode se literaturni podaci vezani za efekte
21 dodatog hroma iz različitih hemijskih formi. U trećem podpoglavlju kandidat navodi podatke
22 vezane za bioraspoloživost hroma. Navode se literaturni podaci vezani za unošenje hroma u
23 organizam, resorpciju hroma, oblike hroma prisutne u cirkulaciji, ulazak hroma u ćelije i
24 izlučivanje hroma iz organizma. Takođe, navode se literaturni podaci o stepenu i obliku
25 zadržavanja hroma u različitim tkivima. U četvrtom podpoglavlju opisuje se biološki značaj
26 hroma. Navode se podaci vezani za uticaj hroma na metabolizam ugljenih hidrata, lipida i
27 nukleinskih kiselina. Poseban deo ovog podpoglavlja opisuje biološki značaj hroma kod teladi
28 i daje presek literaturnih podataka vezanih za eksperimente sa hromom koji su izvedeni na
29 teladima. U petom podpoglavlju kandidat opisuje interakciju hroma sa hormonalnim statusom
30 jedinke. Na početku se navode najznačajniji literaturni podaci vezani za signalni put insulina,
31 a zatim se razmatraju dosadašnja saznanja vezana za uticaj hroma na različite molekule
32 unutar signalnog puta insulina. Zatim se iznose osnovni podaci vezani za IGF sistem i
33 njegovu regulaciju, sa naglaskom na interakciji insulina i IGF sistema. Na kraju se iznosi
34 presek literaturnih podataka vezanih za uticaj hroma na IGF sistem. U okviru ovih
35 podpoglavlja, kandidat kroz prikaz podataka iz literature jasno ukazuje na nedostatak
36 podataka koji se odnose na *in vivo* ispitivanja uticaja hroma na signalni put insulina i na IGF
37 sistem kod teladi. Takođe, naglašava se značaj ovakvih ispitivanja i mogućnost da se kroz
38 njih protumače često kontradiktorni podaci vezani za uticaj hroma na metabolizam teladi.

39 **Cilj istraživanja** u okviru ove doktorske disertacije bio je da se ispita uticaj peroralne
40 aplikacije hroma (organski trovalentni hrom vezan za kvasac) na insulinsku osovину i IGF
41 sistem kod teladi uzrasta od mesec dana do četiri meseca. Ovaj uzrast je odabran jer je to
42 period kada telad prelaze sa mlečne ishrane na ishranu kabastim i koncentrovanim
43 hranivima, svojstvenu odraslim preživarima, odnosno to je period metaboličkog
44 „prestrojavanja“ kod teladi. Da bi se ispunio zadati cilj postavljeni su sledeći **zadaci**: (1) izvesti
45 biopsiju mišićnog tkiva, dva puta u toku trajanja ogleđa, 0. i 70. dana, kod kontrolne grupe
46 teladi i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom. (2) U biopstatima odrediti zastupljenost
47 proteina signalnog puta insulina i to: insulinskog receptora (IR β), supstrata insulinskog
48 receptora fosforilisanog na tirozinu 632 (pIRS-1 Tyr⁶³²), supstrata insulinskog receptora
49 fosforilisanog na serinu 307 (pIRS-1 Ser³⁰⁷), protein kinaze B (Akt) fosforilisane na serinu
50 473 (pAkt Ser⁴⁷³), transportnog molekula za glukozu (GLUT4) i AMP- zavisne protein kinaze
51 (AMPK). (3) Izvesti intravenske testove opterećenja glukozom (IVGTT) četiri puta u toku
52 trajanja ogleđa i to 0., 30., 50. i 70 dana ogleđa kontrolnoj grupi teladi i grupi kojoj je peroralno
53 aplikovan hrom. (4) Na osnovu dobijenih rezultata sa IVGTT, proceniti insulinski odgovor i
54 perifernu utilizaciju glukoze kod kontrolne grupe teladi i grupe kojoj je peroralno aplikovan
55 hrom. (5) Odrediti koncentraciju glukoze i insulina u uzorcima krvnog seruma teladi uzetim u
56 intervalima od 10 dana počevši od uzrasta od mesec dana do četiri meseca, kod kontrolne
57 grupe teladi i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom. (6) Odrediti koncentracije IGF-I i
58 pojedinih IGF vezujućih proteina (IGFBP 1,2,3,4) u uzorcima krvnog seruma teladi 0., 10., 50.
59 i 70 dana ogleđa, počevši od uzrasta od mesec dana do četiri meseca, kod kontrolne grupe
60 teladi i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom. (7) Odrediti koncentraciju odabranih

1 biohemijskih i hormonskih parametara krvi: NEFA, BHBA, holesterola, triglicerida, ukupnih
2 proteina, albumina, globulina i kortizola u uzorcima krvnog seruma teladi u intervalima od 10
3 dana počevši od uzrasta od mesec dana do četiri meseca, kod kontrolne grupe teladi i grupe
4 kojoj je peroralno aplikovan hrom. (8) Izmeriti telesnu masu teladi u intervalima od 10 dana
5 počevši od uzrasta od mesec dana do četiri meseca, kod kontrolne grupe teladi i grupe kojoj
6 je peroralno aplikovan hrom.

7 **Materijal i metode rada** su detaljno opisani u posebnom poglavlju. Na početku
8 ogleđa telad uzrasta mesec dana je podeljena u dve grupe: telad kontrolne grupe (NCr, n=12)
9 koja je dobijala standardan obrok i telad ogleđne grupe (PoCr, n=12) koja je, pored
10 standardnog obroka, svakodnevno peroralno dobijala hrom organski vezan za kvasce (Co-
11 Factor III Cr Yeast, Alltech, 0.1 % Cr⁺³). Hrom (0,04 mg po kg TM), rastvoren u 50 mL mleka,
12 je aplikovan pomoću brizgalice izazivanjem refleksa sisanja. Aplikacija je vršena tokom celog
13 perioda trajanja ogleđa od 70 dana. Teladi kontrolne grupe je u istom periodu peroralno
14 aplikovano mleko bez dodatka hroma, u istoj količini kao i ogleđnoj grupi. Telesna masa teladi
15 obe grupe merena je u intervalima od 10 dana odnosno 0., 10., 20., 30., 40., 50., 60. i 70.
16 dana ogleđa. Tokom ogleđa uzimani su uzorci mišićnog tkiva 0. i 70. dana ogleđa, kao i
17 uzorci krvi u intervalima od 10 dana odnosno 0., 10., 20., 30., 40., 50., 60. i 70. dana ogleđa.

18 Uzorci mišićnog tkiva NCr i PoCr grupe su uzeti perkutanom biopsijom *m.*
19 *semitendinosus*. Analize su obuhvatale određivanje zastupljenosti proteina uključenih u
20 signalni put insulina: insulinskog receptora (IR β), supstrata insulinskog receptora
21 fosforilisanog na tirozinu 632 (pIRS-1 Tyr⁶³²), supstrata insulinskog receptora fosforilisanog
22 na serinu 307 (pIRS-1 Ser³⁰⁷), protein kinaze B (Akt) fosforilisane na serinu 473 (pAkt
23 Ser⁴⁷³), transportnog molekula za glukozu (GLUT4) i AMP- zavisne protein kinase (AMPK).
24 Analize zastupljenosti proteina i fosforilacije molekula signalnog puta insulina iz uzorka
25 ukupnog lizata mišićnog tkiva su određivane *Western blot* metodom. Kvantifikacija dobijenih
26 signala vršena je denzitometrijski korišćenjem softvera ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).

27 Uzorci krvi su uzimani punkcijom *v. jugularis*. Nakon spontane koagulacije na sobnoj
28 temperaturi, serum je izdvajan centrifugiranjem na 3000 obrtaja tokom 10 minuta. Dobijeni
29 krvni serum je skladišten na temperaturi od -20°C, sve do izvođenja analiza. U uzorcima
30 seruma dobijenog 0., 10., 20., 30., 40., 50., 60. i 70. dana ogleđa određivana je koncentracija
31 glukoze, insulina, BHBA, holesterola, triglicerida, ukupnih proteina, albumina, globulina i
32 kortizola. Koncentracija glukoze je određivana korišćenjem komercijalnih dijagnostičkih kitova
33 (Randox, Crumlin, Velika Britanija). Koncentracije beta-hidroksi butirata (BHBA) su određivane
34 kinetičkom enzimskom metodom i korišćenjem komercijalnog dijagnostičkog kita (Randox,
35 Crumlin, Velika Britanija). Koncentracija holesterola, triglicerida, ukupnih proteina, albumina,
36 globulina krvnog seruma određivana je kolorimetrijski i enzimskim metodama korišćenjem
37 komercijalnih test paketa (BioMereux, Marcy-l'Étoile, France). Svi biohemijski parametri
38 izmereni u krvnom serumu su određeni na poluautomatskom biohemijskom analizatoru STAT
39 FAX 3300 AVRENESS TECHNOLOGY INC (SAD). Za određivanje koncentracije insulina
40 korišćen je komercijalni RIA test (RIA-insulin INEP, Beograd, Srbija). Koncentracija kortizola
41 određivana je radioimunološkom metodom korišćenjem komercijalnih test paketa (RIA
42 kortizol, INEP Beograd, Srbija). U uzorcima seruma dobijenim 0., 10., 30., 50. i 70. dana
43 ogleđa određivana je koncentracija IGF-I. Za određivanje koncentracije IGF-I korišćen je
44 komercijalni RIA IGF-I test (INEP, Zemun). U uzorcima seruma dobijenim 0., 10., 50. i 70.
45 dana ogleđa određivana je zastupljenost IGF vezujućih proteina (IGFBP-1,2,3 i 4).
46 Zastupljenost IGFBP je određivana *Western blot* metodom. Kvantifikacija dobijenih signala
47 vršena je denzitometrijski korišćenjem softvera ImageJ (NIH; Bethesda, MD, USA).

48 Intravenski testovi opterećenja glukozom (IVGTT) su izvedeni četiri puta u toku
49 trajanja ogleđa i to 0., 30., 50. i 70 dana ogleđa. Aplikovan je 50% rastvor glukoze (glukoza
50 2,78 mol/L wt/vol; Zorka Šabac, Srbija) bolus infuzijom u dozi od 500 mg/kg telesne mase.
51 Neposredno pre davanja rastvora glukoze uzorkovana je krv (nulto vreme). Naknadni uzorci
52 krvi su uzimani 15., 30., 60., 90. i 120. minuta nakon davanja glukoze. Koncentracije glukoze i
53 insulina su određivane u svim uzorcima, dok su koncentracije NEFA određivane samo u
54 nultim uzorcima. Koncentracija NEFA određivana je korišćenjem enzimске kolorimetrijske
55 metode uz pomoć komercijalnih dijagnostičkih kitova (Randox, Crumlin, Velika Britanija)
56 Kinetika glukoze tokom testa opterećenja je određena korišćenjem sledećih parametara:
57 $To_{glukoza}$ - bazalna koncentracija glukoze, $Pik_{glukoza}$ - maksimalna koncentracija glukoze, k -
58 stepen opadanja koncentracije glukoze tokom testa, $T_{1/2}$ - poluvreme eliminacije glukoze, kao i
59 $AUC_{glukoza}$ - površina ispod krive glukoze tokom testa tolerancije praćena od 0. do 120.
60 minuta. Kinetika insulina tokom testa opterećenja je određena korišćenjem sledećih

1 parametra: $T_{0insulin}$ - bazalna koncentracija insulina, $Pik_{insulin}$ - maksimalna koncentracija
2 insulina, $\Delta MAX_{insulin}$ - maksimalni porast insulina i $AUC_{insulin}$ - površina ispod krive insulina
3 tokom testa tolerancije praćena od 0. do 120. minuta. Za procenu insulinske rezistencije kod
4 teladi je korišćen matematički pokazatelj insulinske senzitivnosti (RQUICKI- revised
5 quantitative insulin sensitivity check index). Za izračunavanje je korišćena formula koju su
6 opisali Holtenius and Holtenius (2007), a za njeno izračunavanje su korišćene bazalne
7 vrednosti glukoze, insulina i NEFA, po modelu: $RQUICKI=1/[\log \text{glukoza (mg/dL)} + \log \text{insulin}$
8 $(\mu\text{U/mL}) + \log \text{NEFA (mM)}]$. Niska vrednost indeksa označava smanjenu osetljivost na insulin.

9 Svi rezultati su predstavljeni tabelarno ili grafički korišćenjem parametara deskriptivne
10 statistike: srednja vrednost \pm standardna greška. Statistička obrada podataka je izvršena
11 korišćenjem programa STATISTICA v.8 (StatSoft, Inc., Tulsa, Ok, USA). Dvosmerna analiza
12 varijanse (eng. Two way ANOVA) je primenjena u cilju određivanja značajnosti između grupa
13 i ispitivanog perioda. Za analizu stepena značajnosti razlika ispitivanih parametara između
14 pojedinih oglednih grupa kao *post hoc* test korišćen je Studentov "t" test. Statistički značajnim
15 su smatrane p vrednosti $<0,05$, $<0,01$ i $<0,001$, dok su vrednosti $\leq 0,1$ prikazane kao
16 pokazatelji tendencije promena određenih parametara.

17 **Rezultati** su prikazani odvojeno za zastupljenost proteina signalnog puta insulina,
18 intravenski test opterećenja glukozom, koncentracije biohemijskih parametara i hormona u
19 krvi, koncentracije IGF-I i zastupljenost IGF vezujućih proteina u krvi.

20 Nije postojala statistički značajna razlika u zastupljenosti IR β između NCr i PoCr
21 grupe na početku ogleada, odnosno pre početka peroralne aplikacije hroma. Tokom oglednog
22 perioda, kod NCr grupe utvrđeno je statistički značajno smanjenje ($p < 0,05$) zastupljenosti
23 IR β , dok je kod PoCr grupe zabeležena tendencija porasta ($p=0.057$) istog molekula.
24 Zastupljenost IR β , 70. dana ogleada, bila je statistički značajno veća ($p < 0,05$) kod PoCr u
25 odnosu na NCr grupu.

26 Nije utvrđena statistički značajna razlika u zastupljenosti pIRS-1 Tyr⁶³² između NCr i
27 PoCr grupe na početku ogleada, odnosno pre početka peroralne aplikacije hroma. Kod obe
28 ispitivane grupe je došlo do porasta pIRS-1 Tyr⁶³² u toku oglednog perioda, s tim što je jedino
29 kod PoCr grupe ovaj porast bio statistički značajan ($p < 0,001$). Zastupljenost pIRS-1 Tyr⁶³²,
30 70. dana ogleada, bila je statistički značajno veća ($p < 0,001$) kod PoCr u odnosu na NCr
31 grupu.

32 Nije utvrđena statistički značajna razlika u zastupljenosti pIRS-1 Ser³⁰⁷ između NCr i
33 PoCr grupe na početku ogleada, odnosno pre peroralne aplikacije hroma. Kod obe ispitivane
34 grupe nije utvrđena značajna promena u zastupljenosti pIRS-1 Ser³⁰⁷ u toku oglednog
35 perioda. Takođe, 70. dana ogleada nije bilo razlike između NCr i PoCr grupe u zastupljenosti
36 pIRS-1 Ser³⁰⁷.

37 Nije utvrđena statistički značajna razlika u zastupljenosti pAkt Ser⁴⁷³ između NCr i
38 PoCr grupe na početku ogleada, odnosno pre peroralne aplikacije hroma. Kod NCr grupe nije
39 bilo promene u zastupljenosti pAkt Ser⁴⁷³ u toku oglednog perioda, dok je zastupljenost pAkt
40 Ser⁴⁷³ kod PoCr grupe statistički značajno porasla ($p < 0,05$). Zastupljenost pAkt Ser⁴⁷³, 70.
41 dana ogleada, bila je statistički značajno ($p < 0,05$) veća kod PoCr grupe u odnosu na NCr
42 grupu.

43 Nije utvrđena statistički značajna razlike u zastupljenosti GLUT4 između NCr i PoCr
44 grupe na početku ogleada, odnosno pre peroralne aplikacije hroma. Kod NCr grupe nije bilo
45 promene u zastupljenosti GLUT4 u toku oglednog perioda, dok je zastupljenost GLUT4 kod
46 PoCr grupe statistički značajno porasla ($p < 0,05$) u toku oglednog perioda. Zastupljenost
47 GLUT4, 70. dana ogleada, kod PoCr grupe imala je tendenciju povećanja ($p=0,09$) u odnosu
48 na NCr grupu.

49 Nije utvrđena statistički značajna razlika u zastupljenosti AMPK između NCr i PoCr
50 grupe na početku ogleada, odnosno pre peroralne aplikacije hroma. Kod NCr grupe nije bilo
51 promene u zastupljenosti AMPK u toku oglednog perioda, dok je zastupljenost AMPK kod
52 PoCr grupe statistički značajno porasla ($p < 0,001$). Zastupljenost AMPK, 70. dana ogleada,
53 bila je statistički značajno veća ($p < 0,001$) kod PoCr grupe u odnosu na NCr grupu.

54 U IVGTT izvedenim 30. i 70. dana, kod PoCr grupe zabeležena je statistički značajno
55 niža bazalna koncentracija glukoze ($T_{0glukoza}$) u odnosu na NCr grupu ($p < 0,05$ za oba testa).
56 Tokom izvođenja IVGTT 50. dana ogleada kod PoCr grupe zabeležne su statistički značajno
57 više ($p < 0,05$) k vrednosti ($1,5 \pm 0,1$ % min) u odnosu na NCr grupu ($1,0 \pm 0,2$ % min), statistički
58 značajno niže ($p < 0,05$) vrednosti za $T_{1/2}$ ($47,4 \pm 4,4$ min) u odnosu na NCr grupu ($73,7 \pm 1,0$
59 min), kao i statistički značajno niže ($p < 0,05$) vrednosti za $AUC_{glukoza}$ ($705,2 \pm 24,2$ mMxmin) u

1 odnosu na NCr grupu (820,9±30,8 mM/xmin). Vrednosti za $Pik_{glukoza}$ se nisu razlikovale
2 između grupa ni u jednom od izvedenih IVGTT.

3 Kod PoCr grupe utvrđena je statistički značajno niža bazalna koncentracija insulina
4 ($To_{insulin}$), u odnosu na NCr grupu, u IVGTT izvedenim 30. i 70. dana ($p < 0,05$ za oba testa).
5 Tokom izvođenja IVGTT 70. dana ogleđa kod PoCr grupe zabeležne su statistički značajno
6 niže ($p < 0,05$) vrednosti za $Pik_{insulin}$ (116,9±15,3 μ U/mL) u odnosu na NCr grupu
7 (173,2±17,1 μ U/mL). Iako se vrednosti za $\Delta MAX_{insulin}$ nisu statistički značajno razlikovale
8 između grupa zabeležena je tendencija smanjenja kod PoCr grupe u IVGTT izvedenim 50. i
9 70. dana. Vrednost $\Delta MAX_{insulin}$ kod PoCr grupe, dobijena u testu izvedenom 50. dana ogleđa,
10 iznosila je 80,1±7,6 μ U/mL naspram vrednosti od 111,4±14,4 μ U/mL za NCr grupu ($p=0,09$),
11 dok je vrednost $\Delta MAX_{insulin}$ kod PoCr grupe, dobijena u testu izvedenom 70. dana ogleđa,
12 iznosila 99,1±14,8 μ U/mL naspram vrednosti od 146,1±17,6 μ U/mL za NCr grupu ($p=0,09$).
13 Vrednosti za $AUC_{insulin}$ se nisu razlikovale među ispitivanim grupama ni u jednom od
14 izvedenih testova opterećenja.

15 Vrednosti za RQICKI su bile statistički značajno više ($p < 0,05$) kod PoCr grupe u
16 IVGTT izvedenim 30. i 50. dana ogleđa. Naime, vrednost RQICKI, u IVGTT izvedenom 30.
17 dana ogleđa, kod PoCr grupe je iznosila 0,5±0,0 naspram 0,4±0,0 kod NCr grupe, dok je
18 vrednost RQICKI izračunata 50. dana ogleđa kod PoCr grupe iznosila 0,5±0,1 naspram
19 0,4±0,0 kod NCr grupe.

20 Zabeležene su niže koncentracije glukoze kod PoCr grupe, u odnosu na NCr grupu, u
21 svim ispitivanim periodima počevši od 20. dana nakon aplikacije, sa statistički značajnom
22 razlikom 30. i 70. dana ($p < 0,05$, pojedinačno). Glikemija kod NCr grupe je 30. dana ogleđa
23 iznosila 4,5±0,2 mM, dok je kod PoCr grupe iznosila 3,7±0,2 mM. Glikemija je, 70. dana, kod
24 NCr grupe iznosila 4,8±0,0 mM naspram 4,6±0,1 mM koliko je iznosila kod PoCr grupe. Nije
25 bilo statistički značajne razlike između grupa u koncentraciji BHBA, NEFA, holesterola,
26 triglicerida, ukupnih proteina i albumina niti u jednom od ispitivanih dana. Zabeleženo je
27 statistički značajno povećanje ($p < 0,05$) koncentracije globulina kod PoCr u odnosu na NCr
28 grupu 50. dana nakon aplikacije hroma kada je kod NCr grupe koncentracija globulina
29 iznosila 34,9±3,5 g/L, a kod PoCr grupe 46,3±3,0 g/L.

30 Zabeležene su statistički značajno niže ($p < 0,05$) koncentracije insulina kod PoCr
31 grupe, u odnosu na NCr grupu, 30. i 70. dana ogleđa, odnosno istih dana kada je utvrđena
32 statistički značajna razlika u koncentracijama glukoze između grupa. Insulinemija kod NCr
33 grupe je 30. dana ogleđa iznosila 20,6±1,8 μ U/mL, dok je kod PoCr grupe iznosila 8,3±1,0
34 μ U/mL. Insulinemija je, 70. dana, kod NCr grupe iznosila 27,0 ±4,3 μ U/mL naspram 17,9±1,4
35 μ U/mL koliko je iznosila kod PoCr grupe. Kod PoCr grupe, 50. dana ogleđa, utvrđena je
36 smanjena koncentracija kortizola kod PoCr u odnosu na NCr grupu, pri čemu je razlika bila na
37 granici statističke značajnosti ($p=0,06$).

38 Kod PoCr grupe zabeležene su statistički značajno niže ($p < 0,05$) koncentracije IGF-
39 I, u odnosu na NCr grupu, 50. dana ogleđa. Koncentracija IGF-I kod NCr grupe je 50. dana
40 ogleđa iznosila 28,5±2,1 nM, dok je kod PoCr grupe iznosila 20,2±2,3 nM. Kod obe ispitivane
41 grupe je utvrđen statistički značajan porast ($p < 0,001$, za obe grupe) koncentracije IGF-I u
42 periodu od 0. do 70. dana ogleđa.

43 Nisu zabeležene razlike u zastupljenosti IGFBP-1, 2 i 4 između grupa ni u jednom od
44 ispitivanih dana. Kod PoCr grupe zabeležena je statistički značajno manja zastupljenost ($p <$
45 $0,05$) IGFBP-3, u odnosu na NCr grupu, 50. dana ogleđa, kada je zabeležena i statistički
46 značajna razlika u koncentraciji IGF-I između grupa.

47 Nije bilo statistički značajnih razlika u telesnoj masi između grupa ni u jednom od
48 ispitivanih dana.

49 U poglavlju **Diskusija**, kandidat je razmotrio dobijene rezultate i uporedio ih sa
50 dostupnim podacima iz domaće i strane literature.

51 52 **VI ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA (navesti zaključke koji su prikazani u doktorskoj** 53 **disertaciji):**

- 54 1. Aplikovani hrom je imao pozitivan efekat na zastupljenost ispitivanih molekula,
55 pozitivnih regulatora signalnog puta insulina u biopstatima mišićnog tkiva teladi.
56 Naime, zabeležen je značajan porast zastupljenosti insulinskog receptora ($IR\beta$),
57 supstrata insulinskog receptora fosforilisanog na tirozinu 632 ($pIRS-1 Tyr^{632}$), protein
58 kinaze B (Akt) fosforilisane na serinu 473 ($pAkt Ser^{473}$), transportnog molekula za
59 glukožu (GLUT4) i AMP- zavisne protein kinaze (AMPK). Peroralno aplikovani hrom

- 1 nije imao efekta na zastupljenost supstrata insulinskog receptora fosforilisanog na
2 serinu 307 (pIRS-1 Ser³⁰⁷), kao negativnog regulatora signalnog puta insulina.
- 3 2. U skladu sa nalazima na molekularnom nivou, intravenski testovi opterećenja
4 glukozom ukazuju na povećanu insulinsku senzitivnost odnosno bolju utilizaciju
5 glukoze kod grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom. Parametri kinetike glukoze koji
6 idu u prilog navedenom zaključku su značajno niže vrednosti za $T_{1/2}$ i $AUC_{glukoza}$, kao
7 i značajno više k vrednosti kod grupe kojoj je aplikovan hrom. Parametri kinetike
8 insulina su bili u manjoj meri promenjeni pod uticajem aplikacije hroma ali su
9 zabeležene značajno niže vrednosti za $Pik_{insulin}$ kod grupe kojoj je aplikovan hrom.
10 Takođe, vrednosti za RQICKI su bile statistički značajno više kod grupe kojoj je
11 peroralno aplikovan hrom.
- 12 3. Kod grupe kojoj je aplikovan hrom zabeležene su značajno niže vrednosti bazalnih
13 koncentracija glukoze i insulina 30. i 70. dana ogleđa, što ukazuje na postojanje
14 energetske deficita kod teladi kojoj je peroralno aplikovan hrom, posebno u periodu
15 nutritivnog prestrojavanja.
- 16 4. Peroralna aplikacija hroma teladi dovela je, 50. dana ogleđa, do smanjenja
17 koncentracije IGF-I i IGFBP-3, koje su bile značajno niže nego kod teladi koja nije
18 dobijala hrom, čime je po svemu sudeći povećana bioraspoloživost IGF-I, odnosno
19 izbegnuti su negativni efekti smanjene koncentracije IGF-I.
- 20 5. Nisu zabeleženi efekti peroralne aplikacije hroma na telesnu masu teladi ni u jednom
21 od ispitivanih perioda.
- 22 6. Dobijeni rezultati ukazuju da peroralno aplikovan hrom značajno utiče na
23 metabolizam teladi, posebno u periodu metaboličkog prestrojavanja, ali da krajnji
24 efekat na performanse teladi (telesnu masu, pre svega) može zavistiti od
25 prilagođenosti energetske komponente obroka povećanom sadržaju hroma u
26 organizmu.

27
28 **VII OCENA NAČINA PRIKAZA I TUMAČENJA REZULTATA ISTRAŽIVANJA (navesti da li**
29 **su dobijeni rezultati u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima istraživanja, kao i da li**
30 **zaključci proizilaze iz dobijenih rezultata):**

31
32 Rezultati istraživanja, koje je u okviru izrade doktorske disertacije sproveo kandidat, su u
33 potpunosti u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima istraživanja. Dobijeni rezultati su
34 prikazani tabelarno i grafikonima, a njihov opis je dat logičnim redosledom, pregledno, jasnim
35 i razumljivim stilom. Izvedeni zaključci su jasno formulisani i u skladu sa postavljenim ciljem i
36 dobijenim rezultatima istraživanja.

37
38 **VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**

39
40 **1. Da li je disertacija napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme?**

41
42 Doktorska disertacija kandidata Ljubomira Jovanovića pod naslovom „Uticaj peroralne
43 aplikacije hroma na insulinsku osovinu i IGF sistem kod teladi holštajn-frizijske rase“ je
44 napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme.

45
46 **2. Da li disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju?**

47
48 Doktorska disertacija kandidata Ljubomira Jovanovića pod naslovom „Uticaj peroralne
49 aplikacije hroma na insulinsku osovinu i IGF sistem kod teladi holštajn-frizijske rase“ sadrži
50 sve bitne elemente u skladu sa zahtevima za završenu doktorsku disertaciju.

51
52 **3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?**

53
54 U okviru ove doktorske disertacije izvršeno je sveobuhvatno ispitivanje uticaja peroralno
55 aplikovanog hroma na insulinsku osovinu i IGF sistem teladi u *in vivo* uslovima. Dobijeni
56 rezultati o mestima interakcije peroralno aplikovanog hroma i molekula signalnog puta
57 insulina su prvi takve vrste u naučnim radovima i omogućavaju dalja istraživanja vezana za
58 mogućnosti modulacije metabolizma teladi od strane hroma, zarad adekvatnog rasta i razvoja
59 jedinke.
60

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
40

IX PREDLOG:

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

- da se doktorska disertacija prihvati a kandidatu odobri odbrana

- da se doktorska disertacija vrati kandidatu na doradu

- da se doktorska disertacija odbije

DATUM
16.8.2017. godine

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

dr Danijela Kirovski, redovni profesor,
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

dr Miodrag Lazarević, redovni profesor,
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

dr Ivan Vujanac, docent,
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

dr Ivan Jovanović, redovni profesor,
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

dr Goran Korićanac, naučni savetnik,
Institut za nulearne nauke «Vinča» Univerziteta u Beogradu