

**UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE**

Sreten N. Nedić

**ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE
KORTIZOLA I KORTIKOSTERONA U
DLACI I MLEKU KRAVA KAO
INDIKATORA STRESA U USLOVIMA
TRETMANA ANTIEKTOPARAZITICIMA**

-Doktorska disertacija-

Beograd, 2018.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

Sreten N. Nedić

**DETERMINATION OF HAIR AND MILK
CORTISOL AND CORTICOSTERONE AS
STRESS RESPONSE INDICATORS IN
COWS TREATED WITH
ANTI-ECTPOARASITIC DRUGS**

-Doctoral Disseratation-

Belgrade, 2018.

Mentori:

Dr Danijela Kirovski, redovni profesor
Fakultet veterinarske medicine Univerzitet u Beogradu

Dr Tomaž Snoj, docent
Veterinarski fakultet Univerzitet u Ljubljani

Članovi komisije:

Dr Ivan Vujanac, docent
Fakultet veterinarske medicine Univerzitet u Beogradu

Dr Goran Korićanac, naučni savetnik
Institut za nuklearne nauke "Vinča" Univerzitet u Beogradu

Dr Željko Sladojević, naučni saradnik
JP Veterinarski institut Republike Srpske "dr Vaso Butozan"
Banja Luka

Datum odbrane: _____

Najveću zahvalnost za uspešan završetak ove doktorske disertacije dugujem svojim mentorima

Profesorki Danijeli Kirovski, koja me je strpljivo vodila i pravovremeno usmeravala u mome naučnom radu, ulažući značajan deo svoga vremena da mi kroz razgovore i savete nesebično prenese veliki deo svog znanja i iskustva.

Profesoru Tomažu Snoj, koji je pomogao u postavljanju i izvođenju oglada, strpljivo i detaljno odgovarao na moja pitanja i preneo mi dragoceno iskustvo u uspostavljanju laboratorijskih metoda značajnih za naučno-istraživački rad.

Zahvaljujem se kolegama sa katedre za Farmakologiju i toksikologiju Veterinarskog fakulteta u Ljubljani na nesebičnoj pomoći i mogućnosti da veliki deo analiza izvedem u njihovoj laboratoriji.

Zahvaljujem se kolegama sa JU Veterinarskog instituta Republike Srpske "dr Vaso Butozan" u Banja Luci, posebno kolegi Oliveru Stevanović i dr Dragi Nedić. Drago mi je da sam imao mogućnost da deo svojih analiza uradim u njihovim laboratorijama.

Zahvaljujem se kolegama sa Instituta za nuklearne nauke "Vinča", posebno Mariji Pantelić i dr Sanji Vranješ-Đurić na pomoći u izvođenju dela laboratorijskih analiza u njihovim laboratorijama.

Zahvaljujem se kolegama sa farme "Ledenička dolina" što su mi izašli u susret i omogućili da izvedem ogled na njihovoj farmi. Hvala i Institutu za biološka istraživanja "Siniša Stanković" na pomoći u identifikaciji ektoprazita kod goveda. Takođe, zahvaljujem se svim kolegama i prijateljima koji su na bilo koji način uticali da uspešno završim ovaj rad, a posebno dr Miloju Đurić, dr Ljubomiru Jovanović i Lazi Babić.

Neizmernu zahvalnost dugujem mojoj porodici, koja je uvek bila uz mene, imala razumevanja i pružala mi uvek podršku u onome što radim.

*Napomena: Ova doktorska disertacija je sufinansirana od strane Ministarstva za školstvo, nauku i sport Vlade Republike Slovenije u okviru **Programa broj P4-0053**, kao i Ministarstva nauke i tehnologije Vlade Republike Srpske u okviru projekata pod nazivom: **"Procjena stresa kod krava utvrđivanjem koncentracije glukokortikosteroida iz bioloških uzoraka dobijenih neinvazivnim tehnikama"**.*

Određivanje koncentracije kortizola i kortikosterona u dlaci i mleku krava kao indikatora stresa u uslovima tretmana antiektoparazitcima

KRATAK SADRŽAJ

Cilj ove doktorske disertacije je bio da se ispita uticaj upotrebe antiektoparazitika na sprečavanje nastanka hroničnog stresa, kroz određivanje koncentracije kortizola i kortikosterona u krvi, dlaci i mleku, kao i na proizvodne sposobnosti životinja, kroz određivanje količine proizvedenog mleka, sastava mleka i broja somatskih ćelija u mleku. Pre izvođenja samog ogleada utvrđene su bazalne vrednosti kortizola u krvi, dlaci i mleku kod holštajn rase goveda, uz ispitivanje uticaja laktacije i rase na koncentracije ovog hormona.

Za utvrđivanje bazalnih vrednosti kortizola u krvi i dlaci odabrano je 25 jedinki holštajn rase (13 krava i 12 junica) i 24 jedinke buša rase (13 krava i 11 junica). Kod istih krava određena je i bazalna vrednost kortizola u mleku, dok je kod junica određena i razlika u koncentraciji kortizola u opranoj i neopranoj dlaci. Kod dodatnih 12 krava holštajn rase i istih junica holštajn rase utvrđena je razlika između koncentracije kortizola u beloj i crnoj dlaci.

Za ispitivanje vrednosti indikatora stresa u uslovima tretmana antiektoparazitcima odabrano je 26 krava holštajn rase. Ogled je izveden tokom letnjeg perioda 2014. godine. Krave su na početku ogleada podeljene u dve grupe, netretirana (n=13) i tretirana (n=13), ali su zbog pojave mastitisa iz tretirane grupe isključene 3 krave, a iz netretirane 1 krava. Pre izvođenja ogleada posmatranjem i daljom identifikacijom je utvrđeno značajno prisustvo ektoparazita, štalske muve (*Stomoxys calcitrans*), na kravama. Odabrana grupa krava je tretirana antiektoparazitikom na bazi *ciflutrina* 0., 28. i 56. dana ogleada. Od svih krava su tokom trajanja ogleada uzimani uzorci krvi, mleka i dlake 0., 21., 42., 63. i 84. dana ogleada (periodi P0, P1, P2, P3 i P4), za određivanje koncentracije kortizola i kortikosterona kao i uzorci mleka za određivanje hemijskog sastava i broja somatskih ćelija u mleku. Takođe, u uzorcima krvi određena je koncentracija glukoze, ukupnih proteina, albumina, globulina, uree, ukupnog bilirubina i aktivnost enzima kreatin kinaze i alkalne fosfataze. Pre određivanja koncentracije kortizola i kortikosterona izvršena je validacija ELISA metode za određivanje ovih parametara u dlaci.

Rezultati bazalnih vrednosti kortizola pokazuju značajno veću koncentraciju ovog hormona kod goveda rase holštajn u odnosu na goveda rase buša, kako u krvi ($p < 0,01$ za krave i $p < 0,05$ za junice), tako i u mleku ($p < 0,05$). Takođe, veća koncentracija kortizola je zabeležena u oba segmenta dlake, proksimalnom i distalnom kod goveda holštajn rase u odnosu na goveda buša rase i to, kod krava ($p < 0,05$ za proksimalni i $p < 0,01$ za distalni segment) i junica ($p < 0,01$ za oba segmenta). Između bele i crne dlake nije bilo značajne razlike ni kod krava ni kod junica. Dodatno, utvrđena je značajno veća koncentracija kortizola u neopranim uzorcima dlake u odnosu na oprane uzorke kod obe rase ($p < 0,01$ redom).

U oglednim grupama, značajno manja koncentracija kortizola u krvi je bila kod tretirane u odnosu na netretiranu grupu u periodima P3 i P4 ($p < 0,01$ redom), dok je koncentracija kortikosterona bila manja u periodima P1, P2, P3 i P4 ($p < 0,01$ za P1 i P2 i $p < 0,05$ za P3 i P4). U mleku nije bilo razlika u koncentraciji kortizola između grupa, dok je koncentracija kortikosterona bila značajno manja u tretiranoj grupi u periodima P1, P2, P3 i P4 ($p < 0,05$ za P1 i $p < 0,05$ za P2, P3 i P4). U proksimalnom segmentu dlake koncentracija kortizola je bila značajno manja u P1 i P2 periodima kod tretirane grupe ($p < 0,05$ redom) dok u distalnom segmentu nije bilo razlike. Koncentracija kortikosterona je bila značajno manja i u proksimalnom i u distalnom segmentu samo u P2 periodu kod tretirane grupe ($p < 0,01$ redom). Tretman nije uticao na koncentraciju kortizola i kortikosterona u crnoj dlaci. U beloj dlaci u odnosu na crnu kod tretirane grupe je bila značajno manja koncentracija kortizola ($p < 0,01$ za P1, P3 i P4 i $p < 0,05$ za P2). Značajna pozitivna korelacija u koncentraciji kortizola je utvrđena između krvi i mleka ($R^2 = 0,187$, $p = 0,05$), dok je značajna pozitivna korelacija u koncentraciji kortikosterona utvrđena između svih medija, krv-mleko ($R^2 = 0,326$, $p = 0,001$); krv-dlaka ($R^2 = 0,269$, $p = 0,004$); mleko-dlaka ($R^2 = 0,496$, $p < 0,001$). Između koncentracije kortizola i kortikosterona značajna pozitivna korelacija je utvrđena u dlaci ($R^2 = 0,238$, $p = 0,012$). Nije bilo značajne razlike u koncentraciji biohemijskih parametara krvi, mlečnosti i sastavu mleka između netretirane i tretirane grupe.

Dobijeni rezultati ukazuju da rasa značajno utiče na bazalne vrednosti kortizola, dok laktacija nema uticaja. Dodatno, tretman antielktoparazitikom dovodi do smanjenja koncentracije indikatora stresa kod tretirane grupe krava, i to smanjenja koncentracije

kortikosterona u krvi i mleku i smanjenja koncentracije kortizola u dlaci, ali bez značajnog uticaja na prosečnu mlečnost i kvalitet mleka.

Ključne reči: kortizol, kortikosteron, krv, mleko, dlaka, ektoparaziti

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Bolesti papkara, fiziologija

UDK broj: 591.1 : 636.2

Determination of hair and milk cortisol and corticosterone as stress response indicators in cows treated with anti-ectoparasitic drugs

SUMMARY

The aim of this doctoral dissertation was to examine impact of anti-ectoparasitic drugs usage on chronic stress prevention, by determining of blood, hair and milk cortisol and corticosterone concentrations, as well as on productive capability of animals, by determining milk yield, milk composition and somatic cell count in milk. Before the beginning of the experiment, the basal values of blood, hair and milk cortisol concentrations were established for Holstein breed, including examination of effects of lactation and breed on concentration of this hormone.

Twenty five Holstein breed animals (13 cows and 12 heifers) and 24 Busha breed animals (13 cows and 11 heifers) were chosen for determination of blood and hair basal cortisol concentrations. The same cows were used for determination of milk basal cortisol concentrations, while differences in cortisol concentrations between washed and unwashed hair were determined using same heifers. Additional 12 Holstein cows and same heifers were used for estimation of cortisol concentrations difference between white and black hair.

Twenty six Holstein cows were included in study for examination of impact of anti-ectoparasitic drugs usage on stress indicators values. Study was obtained during summer season of year 2014. Initially, cows were divided in two groups, non-treated (N=13) and treated (N=13), but due to mastitis, 3 cows from treated and 1 cow from non-treated group were excluded. Before treatment, significant presence of Stable fly ectoparasitic (*Stomoxys calcitrans*) was obtained on cows, by observation and identification. Treated group of cows was treated with anti-ectoparasitic ciflutrin on days 0., 28. and 56. of experiment. Blood, hair and milk samples were taken from all cows in experiment at days 0., 21., 42., 63. and 84. of experiment (periods P0, P1, P2, P3 and P4), for determining cortisol and corticosterone concentrations, as well as milk samples for determination of milk chemical composition and somatic cell counts. Glucose, total protein, albumin, globulin, urea, total bilirubin concentrations and creatine kinase and alkaline phosphatase activity were also determined in blood

samples. Before determination of cortisol and corticosterone concentrations, validation of ELISA method for their determination in hair was obtained.

Basal values for cortisol levels showed significantly higher concentrations in Holstein compared to Busha animals in blood ($p < 0.01$ for cows and $p < 0.05$ for haifers) and milk ($p < 0.05$). Also, higher cortisol concentrations were observed in both hair segments, proximal and distal, in Holstein cattle compared to Busha cattle, in cows ($p < 0.05$ for proximal and $p < 0.01$ for distal segment) and haifers ($p < 0.01$ for both segments). No significant difference was observed between black and white hair neither in cows nor in haifers. Additionally, significantly higher cortisol concentrations were observed in unwashed compared to washed hair samples in both breeds ($p < 0.01$, respectively).

In experimental groups, significantly lower cortisol concentrations were observed in treated compared to non-treated group in P3 and P4 periods ($p < 0.01$, respectively), while corticosteron concentrations were lower in P1, P2, P3 and P4 periods ($p < 0.01$ for P1 and P2 and $p < 0.05$ for P3 and P4). There was no significant difference in milk cortisol concentrations between groups, while corticosteron concentrations were significantly lower in treated group in P1, P2, P3 and P4 periods ($p < 0.05$ for P1 and $p < 0.05$ for P2, P3 and P4). Cortisol concentrations in proximal hair segment were significantly lower in treated group in P1 and P2 periods ($p < 0.05$ respectively), while there was no difference between distal hair segments. Corticosteron concentrations in both proximal and distal hair segment were significantly lower in treated compared to non-treated group only in P2 period ($p < 0.01$, respectively). Treatment did not have affect on cortisol and corticosteron concentrations in black hair. Cortisol concentrations were significantly lower in white compared to black hair in treated group ($p < 0.01$ for P1, P3 and P4 and $p < 0.05$ for P2). Significant positive correlation of cortisol concentrations were estimated between blood and milk ($R^2 = 0.187$, $p = 0.05$), while significant positive correlation of corticosteron concentrations were estimated among all media, blood-milk ($R^2 = 0.326$, $p = 0.001$); blood-hair ($R^2 = 0.269$, $p = 0.004$); milk-hair ($R^2 = 0.496$, $p < 0.001$). Significant positive correlation between cortisol and corticosterone concentrations were estimated in hair ($R^2 = 0.238$, $p = 0.012$). There was no significant difference in blood biochemical parameter concentrations, milk yields and milk composition between treated and non-treated group.

Obtained results indicate that breed, but not lactation, has significant impact on basal cortisol values. Additionally, anti-ectoparasitic treatment leads to decrease level of stress indicators in treated group of cows, meaning decreased corticosterone level in blood and milk and decreased cortisol level in hair, but with no significant influence on average milk yield and milk quality.

Key words: cortisol, corticosteron, blood, milk, hair, ectoparasits

Scientific area: Veterinary medicine

Specific scientific field: Ruminants and swine disease, Physiology

UDK number: 591.1 : 636.2

Sadržaj

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. STRES KOD VISOKO-MLEČNIH KRAVA	3
2.1.1. AKUTNI STRES.....	5
2.1.2. HRONIČNI STRES	7
2.2. INDIKATORI STRESA	8
2.3. BIOLOŠKI MATERIJALI U KOJIMA SE ODREĐUJU INDIKATORI STRESA	10
2.3.1. GLUKOKORTIKOSTEROIDI U KRVI.....	10
2.3.2. GLUKOKORTIKOSTEROIDI U PLJUVAČCI.....	12
2.3.3. GLUKOKORTIKOSTEROIDI U URINU.....	12
2.3.4. GLUKOKORTIKOSTEROIDI U MLEKU	13
2.3.5. METABOLITI GLUKOKORTIKOSTEROIDA U FECESU	14
2.3.6. GLUKOKORTIKOSTEROIDI U DLACI.....	15
2.4. UZROČNICI STRESA	17
2.4.1. VISOKA SPOLJAŠNJA TEMPERATURA KAO STRESOGENI ČINILAC.....	17
2.4.2. TRANSPORT KAO STRESOGENI ČINILAC.....	19
2.4.3. NAČIN DRŽANJA I MANIPULACIJA SA ŽIVOTINJAMA KAO STRESOGENI ČINILAC	20
2.4.4. HIRURŠKI TRETMAN KAO STRESOGENI ČINILAC.....	20
2.4.5. INFEKCIJA KAO STRESOGENI ČINILAC	21
2.4.6. EKTOPARAZITI KAO STRESOGENI ČINIOCI	22
2.5. MERE ZAŠTITE ŽIVOTINJA OD EKTOPARAZITA KAO STRESOGENIH ČINILACA	23
3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA	25
4. MATERIJAL I METODE RADA	26
4.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE	26
4.2. TRETMAN	27
4.3. UZIMANJE UZORAKA KRVI	29
4.4. UZIMANJE UZORAKA MLEKA	29
4.5. UZIMANJE UZORAKA DLAKE	30
4.6. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE KORTIZOLA I KORTIKOSTERONA	30
4.6.1. ODREĐIVANJE KORTIZOLA I KORTIKOSTERONA U KRVI	30
4.6.2. ODREĐIVANJE KORTIZOLA I KORTIKOSTERONA U MLEKU	31
4.6.3. ODREĐIVANJE KORTIZOLA I KORTIKOSTERONA U DLACI.....	31
4.6.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE BIOHEMIJSKIH PARAMETARA U KRVI	33
4.6.5. ODREĐIVANJE HEMIJSKOG SASTAVA I BROJA SOMATSKIH ČELIJA U MLEKU	33
4.7. STATISTIČKA ANALIZA	34
5. REZULTATI	35

5.1. VALIDACIJA ELISA METODE ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE KORTIZOLA U DLACI.....	35
5.1.1. SENZITIVNOST I SPECIFIČNOST TESTA.....	35
5.1.2. PRECIZNOST TESTA.....	36
5.1.3. <i>RECOVERY</i> VREDNOST (ODREĐIVANJE PROCENTA PRINOSA)	36
5.2. VALIDACIJA ELISA METODE ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE KORTIKOSTERONA U DLACI	37
5.2.1. SENZITIVNOST I SPECIFIČNOST TESTA.....	37
5.2.2. PRECIZNOST TESTA.....	37
5.2.3. <i>RECOVERY</i> VREDNOST (ODREĐIVANJE PROCENTA PRINOSA)	38
5.3. BAZALNE VREDNOSTI KONCENTRACIJA KORTIZOLA U KRVI, MLEKU I DLACI	39
5.3.1. BAZALNE VREDNOSTI KONCENTRACIJA KORTIZOLA U KRVI.....	39
5.3.2. BAZALNE VREDNOSTI KONCENTRACIJA KORTIZOLA U MLEKU	39
5.3.3. BAZALNE VREDNOSTI KONCENTRACIJA KORTIZOLA U DLACI.....	40
5.4. KONCENTRACIJE KORTIZOLA I KORTIKOSTERONA U KRVI, MLEKU I DLACI OGLEDNIH KRAVA.....	42
5.4.1. KONCENTRACIJE KORTIZOLA U KRVI.....	42
5.4.2. KONCENTRACIJA KORTIKOSTERONA U KRVI	43
5.4.3. KONCENTRACIJA KORTIZOLA U MLEKU	43
5.4.4. KONCENTRACIJA KORTIKOSTERONA U MLEKU	44
5.4.5. KONCENTRACIJA KORTIZOLA U DLACI.....	44
5.4.6. KONCENTRACIJA KORTIKOSTERONA U DLACI	46
5.4.7. KONCENTRACIJA KORTIZOLA I KORTIKOSTERONA U CRNOJ DLACI I POREĐENJE SA BELOM DLAKOM.....	47
5.5. KORELACIJE KORTIZOLA I KORTIKOSTERONA U KRVI, MLEKU I DLACI.....	50
5.5.1. KORELACIJE KORTIZOLA IZMEĐU KRVI, MLEKA I DLAKE	50
5.5.2. KORELACIJE KORTIKOSTERONA IZMEĐU KRVI, MLEKA I DLAKE	50
5.5.3. UKUPNE KORELACIJE IZMEĐU KORTIZOLA I KORTIKOSTERONA U KRVI, MLEKU I DLACI	51
5.6. KONCENTRACIJA BIOHEMIJSKIH PARAMETARA KRVI OGLEDNIH KRAVA	51
5.7. MLEČNOST OGLEDNIH KRAVA.....	53
5.8. HEMIJSKI SASTAVA MLEKA I BROJ SOMATSKIH ĆELIJA U MLEKU OGLEDNIH KRAVA	54
6. ZAKLJUČCI	67
7. LITERATURA	69

SPISAK SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU

CRH - corticotropin realising hormone (kortikotropni oslobađajući hormon)

ACTH - adrenocorticotropic hormone (adrenokortikotropni hormon)

VP - vazopresin

HPA - hypothalamic pituitary adrenal axis (hipotalamo-hipofizno-adrenalna osovina)

SAM - sympathetic adrenal medullary axis (simpatiko-nadbubrežno-medularna osovina)

NEFA - non esterified fatty acid (neesterifikovane masne kiseline)

BHBA - β -Hydroxybutiric acid (beta hidroksi buterna kiselina)

CK - creatine kinase (kreatin kinaza)

LDH - lactate dehydrogenase (laktat dehidrogenaza)

ALP - alkaline phosphatase (alkalna fosfataza)

CBP - *cortisol binding protein* (kortizol vezujući protein, transkordin)

TMR - total mixed ratio (miksirani obrok)

RIA - Radioimmuno-Assay (radioimunoesej test)

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay (imunoenzimski test)

PBS - Phosphate Buffer Solution (fosfatni pufer sa NaCl)

1. UVOD

Sve životinje odgajane u prirodnim uslovima su evolutivno adaptirane na adekvatan odgovor na stresne stimuluse, jer je to u osnovi njihove borbe za opstanak. U prirodnim uslovima, glavni stres za životinje predstavljaju prirodni predatori, te su te životinje pretežno adaptirane da brzo reaguju na stresni stimulus reakcijom "bori se ili beži". Međutim, selekcijom u stočarstvu koja je pre svega usmerena ka visokoj proizvodnji mleka, kao i promenom načina držanja jedinki, koja je pretežno intenzivnog tipa uzgoja, došlo je do narušavanja pojedinih evolutivno razvijenih fizioloških mehanizama, uključujući i mehanizam adaptacije na stres. Naime, uključivanjem homeoretskih mehanizama, svi ostali procesi u organizmu, a time i reakcija na stres, podređuju se procesu proizvodnje mleka. Istovremeno, visoko proizvodne životinje u intenzivnom uzgoju su izložene sve većem broju stresora koji mogu nepovoljno uticati na dobrobit i zdravlje životinja, pogotovo u uslovima oslabljene otpornosti organizma. Stresori mogu delovati kratkoročno izazivajući akutni stres ili dugoročno izazivajući hronični stres. Akutni stres može biti umerenog ili veoma jakog intenziteta. Na akutni stres životinje obično reaguju intenzivnim odgovorom koji se vidljivo manifestuje. Za razliku od akutnog, hronični stres traje duži vremenski period, nedeljama ili čak mesecima. Kod ovoga tipa stresa reakcija životinje nije tako intenzivna, ali zbog dugog trajanja može dovesti do značajnog poremećaja u funkcionisanju mnogih organskih sistema.

Brojni stresori mogu uticati na goveda i oni se uglavnom dele na abiotičke i biotičke. U abiotičke stresore se ubrajaju uticaj klimatskih faktora, način držanja goveda i ishrana. Biotički stresori su povezani sa dejstvom živih organizama i u njih spadaju bakterijske, virusne i parazitske infekcije. Svi ovi stresori izazivaju pre svega akutni stres kod životinja, ali ako se njihovo dejstvo prolongira na duži vremenski period on može da bude i hroničnog toka. Ektoparaziti svojim prisustvom mogu naneti velike ekonomske štete u govedarskoj proizvodnji. Negativno dejstvo ektoparazita vezano je pre svega za prisustvo hematofagnih insekata koji sišu krv, nanose bol i uznemiravaju životinje. Kako su ektoparaziti, pre svega štalske muve, prisuti u najvećem broju kod životinja na farmama tokom letnjeg perioda, njihovo negativno dejstvo može dugo da traje i da, stoga, izazove hronični stres kod životinja.

Na osnovu brojnih radova koji ukazuju da ektoparaziti izazivaju stres kod visoko-mlečnih krava, pretpostavlja se da bi se njihovom eliminacijom sprečila stresna reakcija kod jedinki i time omogućilo nesmetano odvijanje proizvodnje. U kontroli ektoparazita na farmama je široko rasprostranjena primena hemijskih sredstava. Insekticidi koji se upotrebljavaju formulisani su kao sprejevi sa rezidualnim dejstvom kojima se najčešće prskaju zidovi objekata gde se skuplja najviše ektoparazita. Međutim, danas su sve više u upotrebi sredstva za individualni tretman životinja u cilju zaštite od ektoparazita. Zbog prednosti individualnog tretmana kao i zbog lake primene široko je prihvaćena upotreba *pour-on* antiektoparazitskih sredstava u kontroli infestacije ektoparazita kako na pašnjacima tako i u farmskim uslovima. Da bi se pratio uticaj stresa na životinju koristi se više parametara kojima se meri stepen izloženosti stresu. Parametri koji se koriste su promene u ponašanju životinja, koje mogu biti povezane sa reakcijom na stres, promene u fiziološkim parametrima (ubrzan puls, ubrzano disanje), promene pojedinih biohemijskih parametara krvi, a kao najvažnije, promene u nivou hormona stresa odnosno glukokortikosteroida koje luči kora nadbubrežnih žlezda. Kod goveda je za procenu stresa najznačajnije određivanje koncentracije kortizola i kortikosterona, pri čemu određivanje kortizola ima prednost u odnosu na kortikosteron jer je kortizol primarni hormon stresa kod goveda. Ovi hormoni se mogu određivati u različitim biološkim materijalima, kao što su krv, pljuvačka, urin, mleko, feces i dlaka. Međutim, rezultati su pokazali da se nijednom od navedenih bioloških materijala ne može dati prednost, kada je u pitanju pouzdanost procene stresa na osnovu koncentracije izabranog hormona stresa u određenom materijalu. Naime, postoji veliki broj faktora koji utiču na koncentraciju hormona u određenom biološkom materijalu. To su cirkadijalni ritam lučenje glukokortikosteroida, dužina izloženosti stresu, način dobijanja bioloških uzoraka za određivanje koncentracije glukokortikosteroida. U novijim radovima se, da bi se što bolje procenila izloženost stresu, biološki materijali dele na one u kojima se može procenjivati uticaj akutnog stresa (krv, pljuvačka, urin, mleko) i one u kojima se može procenjivati uticaj hroničnog stresa (feces i dlaka). Dalja istraživanja su potrebna da bi se dala preciznija procena pouzdanosti određivanja koncentracije ovih hormona u pojedinim biološkim materijalima, pri različitim oblicima izloženosti stresogenim činiocima.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. STRES KOD VISOKO-MLEČNIH KRAVA

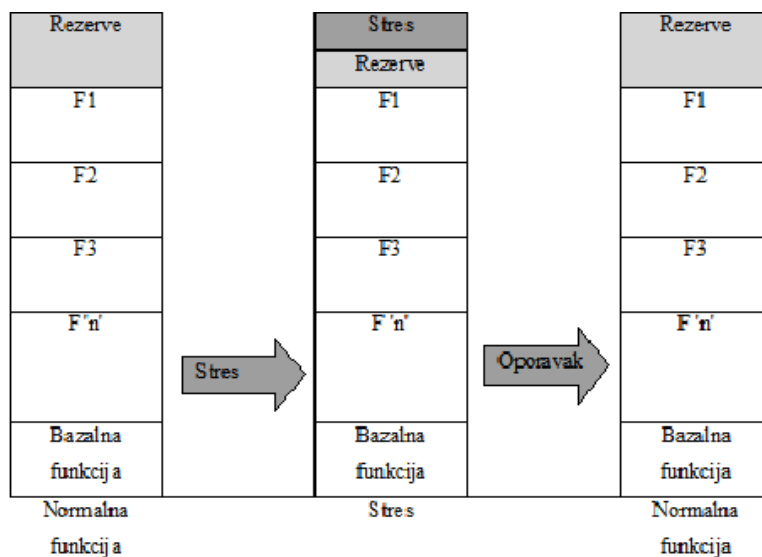
Holštajn rasa goveda je najzastupljenija rasa krava koja se uzgaja za proizvodnju mleka, kako u svetu, tako i u našoj zemlji. Primenom odgovarajućih uzgojno-selekcijских mera, proizvodnja i kvalitet mleka kod holštajn rase povećani su do krajnjih fizioloških granica. Samo zdrave životinje pri optimalnim uslovima ishrane i držanja mogu da ostvare potpuno iskorišćavanje genetski određenog proizvodnog kapaciteta. Svaki poremećaj biološke ravnoteže organizma (homeostaze) predstavlja stres sa svim njegovim specifičnim i nespecifičnim reakcijama.

Stanje stresa označava skup reakcija organizma koje nastaju usled povremenog ili stalnog delovanja činilaca iz spoljašnje sredine ili novonastalih fizioloških stanja u samom organizmu. Kao posledica uticaja ovih, veoma raznovrsnih činilaca, u organizmu nastaju mnogobrojne reakcije koje imaju za cilj prilagođavanje organizma na novonastalo stanje. Najznačajnije reakcije koje nastaju kao odgovor na stanje stresa jesu povećanje sekrecije kortikotropnog rilizing (oslobađajućeg) hormona (*CRH-corticotropin releasing hormone*), adrenokortikotropnog hormona (*ACTH-adrenocorticotropic hormone*) i hormona nadbubrežne žlezde (kortizola i kortikosterona) (Mormede i sar. 2007).

Stresna reakcija je veoma često štetna za organizam. Stres koji izaziva negativne posledice za organizam naziva se distres (Webster, 1983). U uslovima distresa nije moguće prilagođavanje organizma na novonastalu situaciju, pa je tako umanjena i dobrobit životinje (Broom, 2003). Međutim, u nekim slučajevima stres predstavlja neutralno ili pozitivno stanje (eustres) koje deluje na organizam na prijatan i stimulativan način (Trevisi i Bertoni, 2009). Životinje su razvile mehanizme kojima mogu da se izbore sa kratkotrajnim stresorima u svom životu. To znači da organizam adekvatno reaguje na stres, na način da ta reakcija ne utiče značajno na faktore za održavanja života. Primer je iskorišćavanje rezervi glikogena tokom stresne reakcije. Naime, kateholamini koji se luče tokom stresa pretvaraju glikogen u lako iskoristivu glukozu ili druge metaboličke proizvode potrebne za glukoneogenezu. Kada se stresor ublaži, rezerve glikogena se popunjavaju glukoneogenezom do nivoa koji je postojao pre delovanja stresa. U takvom slučaju dobrobit životinja nije ugrožena, jer su ukupni

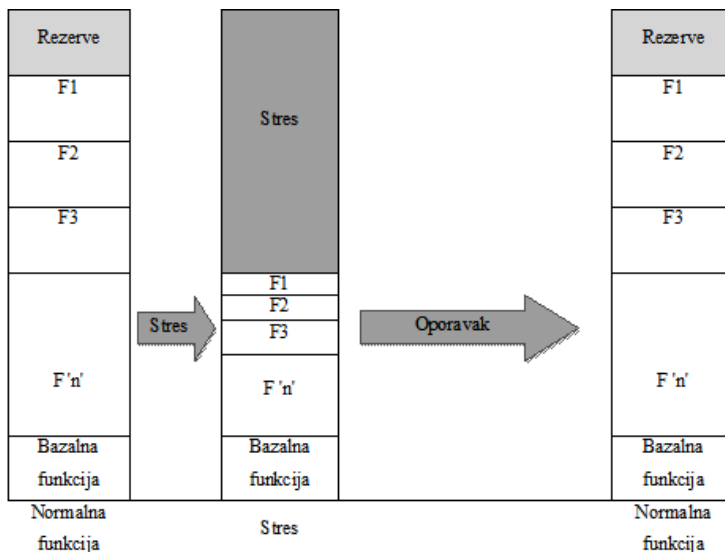
biološki zahtevi organizma za odgovor na stres beznačajni. Međutim, kada nema dovoljno rezervi glikogena da organizam adekvatno odgovori na stres, onda se te rezerve obezbeđuju pokretanjem drugih bioloških funkcija koje mogu da oštete funkcionisanje organizma. Na primer, u slučaju delovanja stresa na organizam mladih životinja, moguć je usporen rast. Takođe, kod životinja koje su namenjene proizvodnji ili su u reproduktivnom ciklusu, moguće je da se energija neophodna za proizvodnju, odnosno reprodukciju usmeri ka prevazilaženju stresa, zbog čega takve životinje smanjuju proizvodnju i imaju reproduktivne probleme. Ovakvo stanje traje sve dok se ne povrate rezerve energije neophodne za prevazilaženje stresa (Moberg i Mench, 2000) (Slika 1) (Slika 2).

Slika 1. Preusmeravanje bioloških resursa kao reakcija na umereni stres (preuzeto iz Moberg i Mench, 2000)



Na slici 1 prikazan je odgovor različitih bioloških funkcija organizma (F1-F'n') tokom umerenog stresa. U ovom slučaju, tokom umerenog stresa, koriste se samo rezervni resursi za prevazilaženje stresa. Ukupan odgovor na stres traje onoliko dugo koliko je potrebno da se biološki resursi preusmere i rezerve popune i vrate na prvobitni nivo.

Slika 2. Preusmeravanje bioloških resursa kao reakcija na teški stres (preuzeto iz Moberg i Mench, 2000)



Na slici 2 je prikazano kako se vrši preusmeravanjem bioloških resursa tokom prevazilaženja teškog stresa. Tada se značajno narušavaju biološke funkcije dovodeći do distresa. U poređenju sa umerenim stresom zahtevi za prevazilaženje teškog stresa i dužina vraćanja u prvobitno stanje su mnogo veći, odnosno duži.

Stres se, u odnosu na dužinu trajanja posledičnih efekata, može podeliti na akutni (prolazni) stres ili hronični (dugotrajni) stres (Trevisi i Bertoni, 2009).

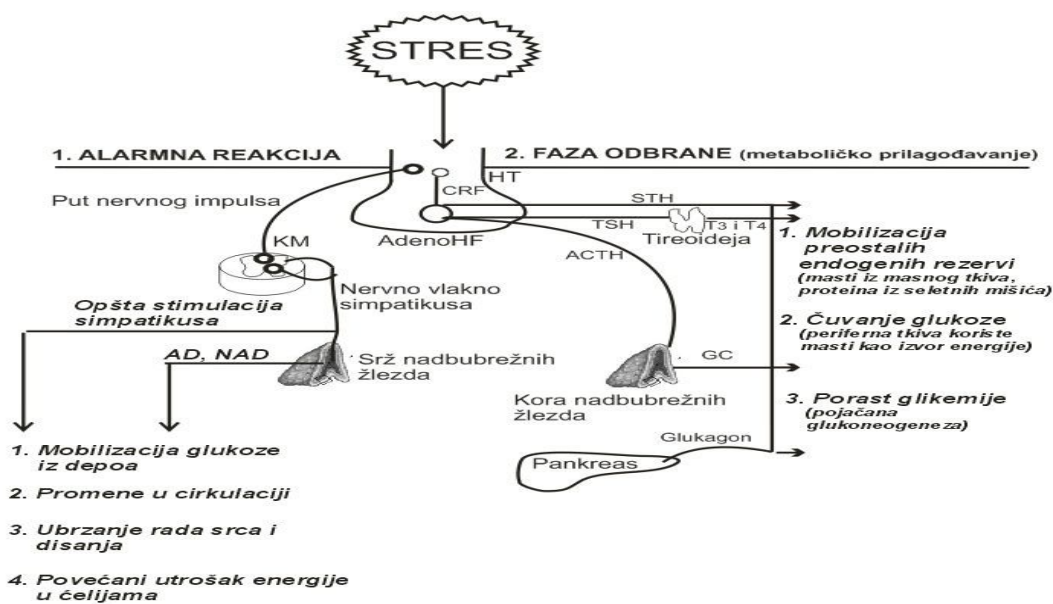
2.1.1. Akutni stres

Akutni stres se javlja kao posledica kratkotrajnog negativnog uticaja na organizam, koji je takvog stepena da omogućava brzo i potpuno vraćanje organizma u stanje fiziološke ravnoteže uz potpunu adaptaciju na novonastale uslove. Iz tog razloga je ovo stanje jednostavno definisati ali ne i izmeriti, jer odgovor nastaje veoma brzo i traje kratko (Trevisi i Bertoni, 2009).

Postoje dva različita signalna puta pomoću kojih organizam sisara reaguje na uočeni stresni stimulans. Jedan odgovor na stresni stimulans pokreće se na nivou hipotalamusa koji oslobađa CRH i vazopresin (VP) (Minton, 1994). Ovi hormoni prenose signal hipofizi da pokrene oslobađanje ACTH kome je kora nadbubrežne žlezde ciljno mesto za delovanje. Ova osovina se naziva hipotalamo-hipofizno-adrenalna

osovina (HPA-*hypothalamic pituitary adrenal axis*) i predstavlja odgovor endokrinog sistema na stresnu reakciju, koji ima za krajnji efekat oslobađanje glukokortikosteroida (kortizola i kortikosterona) iz kore nadbubrežne žlezde. Drugi signalni put reaguje veoma brzo i pokreće simpatiko-nadbubrežno-medularnu osovina (SAM-*sympathetic adrenal medullary axis*), koja aktivira odgovor poznat kao "bori se ili beži" (Chen i sar. 2005). Prema tome, tokom stresa najpre se aktivira SAM osovina koje je izazvana delovanjem „alarmirajućih signala“ na koru velikog mozga, koji se prenose na limbni sistem i simpatikusni nervni sistem. Nakon toga aktivira se HPA osovina, koja izaziva takozvanu "fazu odbrane" organizma od stresnih stimulusa (Trevisi i Bertoni, 2009) (Slika 3).

Slika 3. Faze stresne reakcije i shema aktivacija signalnih puteva (preuzeto od Šamanc i Kirovski, 2008)



Na slici 3 prikazane su osnovne reakcije organizma na delovanje stresa (HT-hipotalamus, Adeno HF-adenohipofiza, KM-kičmena moždina, CRF-kortikotropin oslobađajući faktor, STH-somatotropni hormon, TSH-tireostimulišući hormon, T3-trijodtironin, T4-tiroksin, ACTH-adrenokortikotropni hormon, GC-glukokortikosteroidi, AD-adrenalin, ND-noradrenalin)

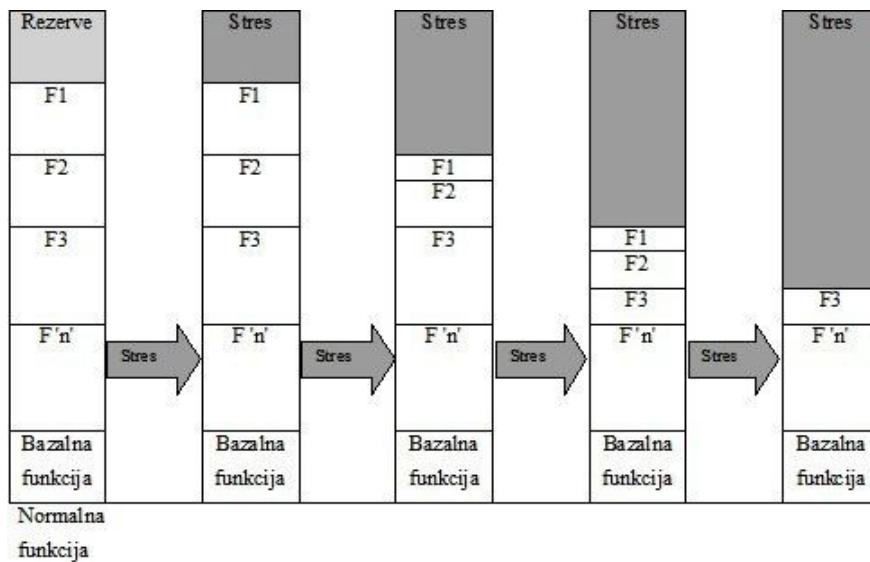
Tokom akutnog stresnog odgovora povećava se aktivnost vitalnih organa, odnosno povećava se frekvencija rada srca i disanja, aktivira se nervni sistem i povećava se mobilizacija energije uz smanjenje apetita (Sapolski i sar. 2000).

2.1.2. Hronični stres

Učestalo delovanje stresnih činilaca na organizam tokom dužeg vremenskog perioda predstavlja hronični ili kontinuirani stres (Moberg i Mench, 2000). Ovaj oblik stresa se dešava u slučajevima kada se ponavlja izlaganje istom akutnom stresoru ili je u pitanju sadejstvo više stresora u dužem vremenskom periodu na koje organizam ne može adekvatno da odgovori. Kao posledica hroničnog stresa može nastati trajna promena jednog ili više parametara u organizmu u odnosu na uobičajene vrednosti (Trevisi i Bertoni, 2009).

Ponovljenim izlaganjem životinje istom stresoru tokom dužeg perioda dolazi do povećane potrošnje energetske rezerve organizma, koje tokom vremena može negativno da utiče na druge biološke funkcije u organizmu. Rezultat ove kumulativne potrošnje je nastanak distresa (Slika 4).

Slika 4. Zbirni efekat ponovljenog delovanje stresnog faktora kroz duže vreme (preuzeto od Moberg i Mench, 2000)



Na slici 4 je prikazano kumulativno dejstvo tokom ponovljenog izlaganja organizma istom stresoru. Prvo izlaganje ne dovodi do preusmeravanja bioloških funkcija ali daljim izlaganjem tokom vremena dolazi do ozbiljnog uticaja na ostale biološke funkcije u cilju reagovanja na stresnu reakciju.

Dokazano je da učestalo izlaganje životinja stresogenim činiocima, odnosno hroničnom stresu, menja stepen aktivnosti i dužinu trajanja odgovora HPA osovine na stimulaciju. Kao što je poznato, svaki deo ove osovine može da bude izložen stimulaciji (uticaj CRH na oslobađanje ACTH u hipofizi, uticaj ACTH na oslobađanje kortizola u kori nadbubrega) ili inhibiciji (mehanizmom negativne povratne sprege glukokortikosteroida) (Finki sar. 1991).

2.2. INDIKATORI STRESA

Tokom odgovora na stresnu reakciju dolazi do aktiviranja SAM i HPA osovine i promene u koncentraciji hormona koji su pod kontrolom ovih regulatornih sistema. Hormoni koji se luče pod kontrolom ovih sistema predstavljaju i glavne indikatore stresa.

Pošto se kod stresne reakcije prvo aktivira SAM osovina, kao reakcija dolazi do povećanja koncentracije kateholamina (adrenalina i noradrenalina) kao prvih indikatora stresa. Kako povećanje koncentracije kateholamina traje veoma kratko, svega nekoliko sekundi, njihovo određivanje i upotreba rezultata za procenu stresa je teška za primenu (Sapolanski i sar. 2000). Međutim, fiziološki efekti koji nastaju dejstvom kateholamina su uočljivi i podrazumevaju povećanje srčane frekvence i ubrzanje disanja, a pored njih su prisutni još i povećana mobilizacije energije, stimulacija imunskog sistema i smanjenje apetita. Aktivacija svih ovih funkcija je u skladu sa potrebama organizma da reaguje na stres reakcijom "bori se ili beži" (Chen i sar. 2005; Trevisi i Bertoni, 2009).

HPA osovina koja se aktivira nakon SAM osovine predstavlja ključnu komponentu neuroendokrinog odgovora na stresnu reakciju. Aktivacijom ove osovine tokom nekoliko minuta nastaje povećanje koncentracije glukokortikosteroida u krvi koje se održava i do jednoga časa kao odgovor na stresnu reakciju (Sapolanski i sar. 2000).

Kod odraslih goveda, kortizol i kortikosteron su dva najvažnija glukokortikosteroida. Prema tome, to su i glavni indikatori stresa kod goveda te se njihovim određivanjem u različitim biološkim materijalima može proceniti dužina izloženosti stresnoj reakciji. Sekretija glukokortikosteroida, prevashodno kortizola, iz

ćelija kore nadbubrežnih žlezda je gotovo potpuno regulisana sa ACTH koga luči adenohipofiza. Lučenje ACTH kontroliše CRH iz hipotalamusa (Brown, 1994).

Svi kortikosteroidi nastaju iz holesterola koji se u ćelijama sintetiše iz acetata ili u njih dospeva iz sistemske cirkulacije. U citoplazmi ćelija holesterol se odlaže u obliku holesterol estra, ili se u glatkom endoplazmatskom retikulumu i mitohondrijama koristi za sintezu kortikosteroida. Glukokortikosteroidi se sintetišu u ćelijama zone fascikulate i retikularis. Ovi hormoni utiču na metabolizam ugljenih hidrata, masti i belančevina, kao i na tok i intenzitet zapaljenjske reakcije. Utiču i na limfatično tkivo, smanjujući broj limfocita i eozinofilnih granulocita u krvi. Delimično utiču na metabolizam vode i elektrolita. Međutim, postoje podaci da periferna tkiva i organi mogu takođe sintetisati *de novo* glukokortikosteroide iz holesterola (Taves i sar. 2011).

Kortizol dominira u krvnoj plazmi novorođene teladi, dok se kortikosteron pojavljuje kasnije, od desetog do četrnaestog dana života. Kako kortizol dominira kod goveda u krvnoj plazmi, odnosno serumu, njegova koncentracija u odnosu na koncentraciju kortikosterona je veća i iznosi približno 2,4:1. Međutim, odnos koncentracije kortizola i kortikosterona kod visoko-mlečnih holštajn krava je dosta veći i iznosi približno 4:1 pa i više (Venkataseshu i Estergreen, 1970). Poluživot glukokortikosteroida u krvnom serumu je relativno kratak i za kortizol iznosi 60-90 minuta, a za kortikosteron oko 50 minuta (Šamanc i Kirovski, 2008).

Pored glukokortikosteroida kao glavnih indikatora stresa, povećanje nivoa β -endorfina tokom bolnih stanja kod životinja može biti indikator stresa (Trevisi i Bertoni, 2009). β -endorfini su produkti cepanja proopiomelanokortina pri čemu nastaje i ACTH. Njihov glavni efekat je u centralnom nervnom sistemu i vezan je za reakciju na bolna stanja. Osawa i saradnici (2000) navode značajno povećanje β -endorfina kod krava koje su imale teška teljenja i zaostalu posteljicu u odnosu na krave koje su imale normalno teljenje i normalan puerperium. To ukazuje da bolna stanja koja su stres za životinju zahtevaju veći nivo ovih hormona ali za njihovu upotrebu u proceni stresa potrebno je više podataka (Trevisi i Bertoni, 2009).

Od drugih indikatora stresa povećanje odnosa između neutrofila i limfocita može biti parametar pri proceni hroničnog stresa (Brom, 2006).

Od biohemijskih parametara koji se mogu koristiti za procenu izloženosti stresu značajni su pre svega povećanje koncentracije neesterifikovanih masnih kiselina

(NEFA), β -hidroksibuterne kiseline (BHBA), uree kao i smanjenje koncentracije glukoze, što su sve indikatori nedovoljnog unošenja hrane kod životinja u stresnim uslovima. Povećanje koncentracije ukupnih proteina i albumina može nastati kao posledica dehidratacije u stanjima akutnog stresa, dok se u stanju hroničnog stresa izazvanog bolesnim stanjima može povećati koncentracija proteina akutne faze (serum amiloid A, haptoglobin i ceruloplazmin). Aktivnost enzima kreatin kinaze (CK), laktat dehidrogenaze (LDH) i alkalne fosfataze (ALP) takođe može biti povećana u stresnim stanjima (Trevisi i Bertoni, 2009).

2.3. BIOLOŠKI MATERIJALI U KOJIMA SE ODREĐUJU INDIKATORI STRESA

Kortizol i kortikosteron, kao glavni indikatori stresa kod goveda, su produkti kore nadbubrežne žlezde i luče se direkto u krv. Međutim, osim u krvi, kortizol i kortikosteron mogu da se nađu i u drugim biološkim materijalima kao što su pljuvačka, mleko, urin, feces i dlaka.

2.3.1. Gukokortikosteroidi u krvi

Kortizol se u krvi nalazi u vezanom i slobodnom obliku. Preko 90% od ukupne količine kortizola u krvi nalazi se vezano za proteine, kortizol vezujući globulin (CBP- *cortisol binding protein*) (60-80%) i albumin (10 do 15%) (Gayrard i sar. 1996). CBP je jedan od α globulina koji se sintetiše u jetri, a pored kortizola može da vezuje i druge steroidne hormone kao što su progesteron, kortikosteron i deoksikortikosteron (Breuner i sar. 2002). Ipak CBP pokazuje značajno veći afinitet prema glukokortikosteroidima. Međutim, zbog mnogo veće koncentracije u krvnoj plazmi i albumini imaju značajnu ulogu u transportovanju hormona u sistemskoj cirkulaciji. U uslovima povećanog lučenja kortikosteroida ne menja se značajno količina ovih hormona vezanih za transkortin (kortizol vezujući globulin), ali se povećava količina slobodnog hormona i onog vezanog za albumin. Kod goveda je relativno niska koncentracija CBP, pa se kod njih koncentracija kortizola u krvnoj plazmi kreće u širokom opsegu, od 1,45 (Šamanc i sar. 1999) do 14,5 ng/ml (Hristov i sar. 1994). Zbog toga su vrednosti koncentracije kortizola u krvnoj plazmi goveda u nekim slučajevima niže od fiziološkog nivoa, a u drugim slučajevima su veoma visoke. Koncentracija slobodnog, proteinski nevezanog

ili aktivnog kortizola u fiziološkim uslovima je niska i čini samo 8 do 10% od ukupne količine kortizola u krvnoj plazmi što se u numeričkim vrednostima kreće u opsegu od 0,15 do 0,36 ng/ml (Schutt i Fell, 1985; McDonald i Pineda, 1989). Samo slobodni i kortizol vezan za CBP su biološki aktivane forme i mogu da utiču na aktivnost ciljnih tkiva. Pošto se steroidni hormoni odmah nakon sinteze izlučuju u krv, tj. nema njihovog deponovanja u kori nadbubrežnih žlezda, njihovim vezivanjem za proteine krvne plazme stvara se jedna vrsta rezerve ovog hormona koja omogućuje snabdevanje ciljnih tkiva ovim hormonima prema njihovoj potrebi. Sa druge strane ciljna tkiva su zaštićena od uticaja prevelikih količina kortizola zbog njihove diskontinuirane sekrecije (pulzatornog lučenja). Naime, poznato je da kod mlečnih krava postoji pulzatorno lučenje kortizola sa periodičnim trajanjem od oko 90 minuta (Mormede i sar. 2007), ali je dnevni ciklus varijacija genetski određen i kod goveda najveće vrednosti koncentracije kortizola su od 4,30^h do 6,30^h i u 18,30^h (Macadam i Eberhart, 1972).

Na koncentraciju kortizola u krvi utiče značajan broj faktora, počevši od dnevnih varijacija u koncentraciji, rase, starosti, preko uticaja spoljašnjih faktora kao što je ishrana, temperatura, režim osvetljenja, do uticaja stresa kao faktora koji dovodi do najvećih promena u koncentraciji kortizola u krvi (Mormede i sar. 2007). Pošto estrogenski hormoni stimulišu sintezu transkortina u jetri, koncentracija kortizola se povećava do kraja graviditeta, dok u slučajevima degenerativnih promena u jetri koncentracija kortizola se smanjuje. Tokom stresa, gubi se dnevni ritam lučenja kortizola i njegova koncentracija se značajno povećava (Greenwood i Shutt, 1992). Pošto sam postupak uzimanja krvi od životinje zahteva hvatanje i fiksiranje iste, to može da predstavlja stresogeni činiac koji utiče na koncentraciju kortizola u krvi. Iz tog razloga, uzorke krvi od životinja trebalo bi uzeti sa što manje uznemiravanja i u roku od 2-3 minuta nakon hvatanja (Mormede i sar. 2007).

Za kortikosteron u krvi važe ista pravila kao i za kortizol, ali je on sekundarni kortikosteroid kod goveda i njegova koncentracija je značajno manja u odnosu na kortizol. Bazalna koncentracija kortikosterona u krvi je znatno niža u odnosu na kortizol i kod krava rase holštajn i iznosi 1,0 do 2,1 ng/ml (Venkateseshu i Estergreen, 1970; Morrow i sar. 2002).

2.3.2. Glukokortikosteroidi u pljuvački

Koncentracija kortikosteroida može se određivati u pljuvački koja predstavlja biološki materijal koji se dobija na manje stresogen način u odnosu na krv. Posebno je pogodna za određivanje koncentracije kortizola u uslovima kada je potrebno višekratno uzimanje uzoraka u kratkom vremenskom intervalu (Fell i Shutt, 1986).

Kortizol prelazi u pljuvačku pasivnom difuzijom tako da se njegova koncentracija ne menja sa promenom količine pljuvačke (Riad-Fahmy i sar. 1982).

Uzorkovanje pljuvačke kod goveda najčešće se obavlja sunđerom ili pamučnom gazom koja se hirurškim kleštima postavlja u usnu duplju. Nakon što se sunđer ili pamučna gaza potpuno natopi pljuvačkom, stavlja se u plastični špric i potiskivanjem klipa dobija se tečni uzorak koji se šalje u laboratoriju na analizu. Za analizu je potrebno 2 mililitra pljuvačke. Čuvanje uzoraka pljuvačke do izvođenja analiza ne predstavlja problem budući da se koncentracije glukokortikosteroida ne menjaju značajnije čuvanjem na -20°C tokom 6-9 meseci kao ni na $+4^{\circ}\text{C}$ do 7 dana (Riad-Fahmy i sar. 1982).

S obzirom da kortizol u pljuvačku prelazi pasivnom difuzijom, u pljuvački se nalazi samo slobodna frakcija kortizola iz krvi. Vezana frakcija kortizola ne može da pređe barijeru između pljuvačke i krvi, tako da je njegova koncentracija u pljuvački u rasponu od 0,11 do 1,23 ng/ml (Fell i Shutt, 1986). Takođe, između koncentracije kortizola u krvnoj plazmi i pljuvački postoji visoka pozitivna korelacija, koja se menja sa povećanjem koncentracije kortizola u krvi delovanjem nekoga stresogenog činioca (Negrao i sar. 2004).

2.3.3. Glukokortikosteroidi u urinu

Kortizol i njegovi metaboliti se putem urina kao glavnog puta eliminacije izbacuju iz organizma. Najveći procenat metabolita kortizola se nakon konjugacije sa glukuronskom ili sumpornom kiselinom u jetri izlučuje mokraćom. Urin kao biološki materijal povoljan je za određivanje koncentracije kortizola jer je njegovo dobijanje nestresogeno za životinju. Takođe, postoji visoka pozitivna korelacije u koncentraciji kortizola u urinu sa koncentracijom slobodnog kortizola u krvnoj plazmi (Šamanc i Kirovski, 2008). Pored toga što je uzorkovanje urina nestresogeno i zahtevi za pripremu uzorka su minimalni. Određivanje koncentracije kortizola u urinu nam daje i alternativu za određivanje kratkoročnog i stresa srednje dužine trajanja kod mlečnih krava (Morow

i sar. 2000). Nivo hormona u urinu se izražava kao odnos hormon/kreatinin da bi se uzele u obzir razlike u proizvodnji urina s obzirom da se kreatinin izlučuje u relativno nepromenjenoj količini. Tako se koncentracija kortizola u urinu izražava kao ng kortizola/mg kreatinina i ona kod holštajn krava iznosi 9 do 11 ng/mg kreatinina (Higashiyama i sar. 2005), dok Morow i saradnici (2000) navode dosta veće bazalne vrednosti kortikosteroida u urinu koja iznosi 53 ng/mg kreatinina kod krava u štalskim uslovima i 101 ng/mg kreatinina kod krava na paši.

2.3.4. Glukokortikosteroidi u mleku

Mleko predstavlja još jedan biološki medijum u kome mogu da se određuju glukokortikosteroidi. Značaj određivanja kortikosteroida u mleku ogleda se pre svega u potpuno neinvazivnom načinu dobijanja uzoraka, dok je ograničavajući faktor što se mleko kao uzorak može koristiti samo u periodu laktacije životinje. Slobodna frakcija kortizola prelazi iz krvne plazme u mleko i povećanje njegove koncentracije u mleku može da bude pokazatelj izloženosti akutnom stresu kod krava (Bremel i Gangwer, 1978). Pored značaja za procenu aktivnosti HPA osovine tokom izloženosti stresnim faktorima, glukokortikosteroidi zajedno sa drugim hormonima u mlečnoj žlezdi imaju uticaj na razviće mlečne žlezde, laktogenezu i održavanje laktacije (Schwalm i Tucker, 1978). Koncentracija kortizola u mleku je značajno manja nego u krvi i iznosi 4% do 10% u odnosu na koncentraciju u krvnoj plazmi (Tucker i Schwalm, 1977).

Kada pređu u mleko kortikosteroidi se vežu za proteine mleka, kazein i laktoalbumine i laktoglobuline (proteini surutke), a jedan deo ostaje slobodan, nevezan. Od ukupne količine kortikosteroida u mleku, 70% do 85% nalazi se vezano za kazein i proteine surutke u jednakom odnosu. Kao što je navedeno, odnos koncentracija kortizola i kortikosterona u krvi je 4:1, međutim u mleku je taj odnos oko 1:1. Schwalm i Tucker (1978) ovo objašnjavaju većim preuzimanjem kortikosterona od strane mlečne žlezde, katabolizmom kortizola u mlečnoj žlezdi i transformacijom kortizola u kortikosteron u mlečnoj žlezdi. Koncentracija kortizola u mleku određuje se u mlečnom serumu, nakon ekstrakcije iz proteina mleka, i može varirati između različitih rasa krava, npr. značajno je veća kod rase holštajn u odnosu na simentalsku rasu (Sgorloni sar. 2015). Postojanje određenih dnevnih varijacija u koncentraciji kortizola u mleku utvrdili su Verkerk i saradnici (1996), tako što su koncentraciju kortizola određivali u mleku iz jutarnje i večernje muže. Oni su dobili veće vrednosti kortizola u uzorcima

mleka iz večernje muže, što se moglo objasniti uticajem toplotnog stresa jer su ogleđ izvodili u letnjem periodu ili negativnim uticajem ektoparazita koji su u velikom broju povezani sa toplim vremenom.

Fukasawa i saradnici (2008) su u svojim rezultatima pokazali da koncentracija kortizola u mleku nema uticaja na sadržaj mlečne masti, proteina, suve materije kao ni na broj somatskih ćelija u mleku. Isti autori su pokazali da stadijum laktacije ima značajnog uticaja na koncentraciju kortizola u mleku. Oni su uporedili podatke o koncentraciji kortizola u mleku iz četiri perioda laktacije, od 7-90 dana, od 91-180 dana, od 181-270 dana i preko 271 dana, i utvrdili značajno veću koncentracija kortizola u prvih 90 dana laktacije u odnosu na ostale periode.

Koncentracija kortizola u mleku kod holštajn rase kreće se od 0,72 do 1,45 ng/ml (Verkerk i sar. 1996; Gygax i sar. 2006). Određivanje koncentracije kortizola u mleku može biti indikator izloženosti stresu koji je nastao nekoliko časova pre uzimanja uzoraka mleka (Verkerk i sar. 1998).

2.3.5. Metaboliti glukokortikosteroida u fecesu

U fecesu životinja nalaze se krajnji produkti razlaganja glukokortikosteroida, čiji se katabolizam odvija pretežno u jetri, pri čemu stvoreni metaboliti putem žuči dospevaju u creva. Dolaskom u creva, ovi metaboliti podležu dalje metaboličkim modifikacijama pod uticajem crevne mikroflore, nakon čega se jedan deo metabolita vraća u cirkulaciju enterohepatičnim putem, a jedan deo se eliminiše fecesom. U fecesu krava su prisutni metaboliti kortizola i kortikosterona koji pripadaju grupi 11,17-dioksiandrostana (11,17 - DOA) (Palme i sar. 1999; Šamanc i Kirovski, 2008).

Feces kao biološki materijal pogodan je za određivanje metabolita glukokortikosteroida jer je njegovo dobijanje takođe potpuno nestresogeno za životinju. Kod određivanja metabolita glukokortikosteroida u fecesu, od izuzetnog značaja je čuvanje i priprema uzoraka fecesa. Za određivanje metabolita 11,17-DOA bitno je da su uzorci sveži i da se odmah nakon sakupljanja čuvaju zamrznuti na -20°C do izvođenja analiza. To je značajno iz razloga što se koncentracija 11,17-DOA u fecesu povećava i do 136% na sobnoj temperaturi tokom prvoga časa nakon defekacije jer dolazi do povećavanja količine metabolita pod dejstvom brojnih enzima bakterija iz fecesa (Möstl i sar. 1999). Iz tog razloga veoma je bitan vremenski period od defeciranja do zamrzavanja uzoraka fecesa. Međutim, u istraživanjima Morrow i saradnika (2002)

metaboliti iz fecesa koji su detektovani imunoreaktivnim antitelima za kortikosteron bili su stabilni i 12 časova na sobnoj temperaturi, odnosno 24 časa ako su čuvani na ledu. Određivanjem metabolita glukokortikosteroida u fecesu može se proceniti izloženost životinja stresnim reakcijama (Möstl i sar. 1999). Primena neinvazivne tehnike za praćenje koncentracije metabolita kortikosteroida u uzorcima fecesa predstavlja korisnu metodu za procenu dobrobiti kod životinja, posebno što se lako primenjuje na farmama (Palme, 2012). Za procenu rezultata koncentracije metabolita kortikosteroida u fecesu važno je znati da do njihovog značajnog povećanja kao odgovor na stresogene činioce dolazi dan nakon izlaganja stresu, a pik vrednosti se dostiže drugoga dana (Morrow i sar. 2002). Bazalne vrednosti za koncentraciju 11,17-DOA u fecesu su $567,5 \pm 101,8$ ng/g fecesa, a za metabolite glukokortikosteroida detektovane antitelima za kortikosteron $11,2 \pm 0,8$ ng/g fecesa (Morrow i sar. 2002).

2.3.6. Glukokortikosteroidi u dlaci

Određivanje glukokortikosteroida u dlaci predstavlja neinvazivan i dobar metod za procenu izloženosti hroničnom stresu. Upotreba dlake kao biološkog medijuma za procenu izloženosti hroničnom stresu ispitivana je kod ljudi (Suave i sar. 2002), pasa (Benet i Hayysen, 2009), mlečnih krava i junica (Comin i sar. 2011; González-de-la-Vara i sar. 2011). Dlaka kod mlečnih krava raste od 0,6 do 1 cm mesečno, što zavisi od lokalizacije na telu životinje, tako da dlaka i do 10 puta brže raste na donjem delu repa u odnosu na dlaku sa grebena i vrata, a za oko 3 meseca završi svoj puni rast i zameni se novom (Comin i sar. 2011; Burnett i sar. 2014). Na osnovu ovih saznanja možemo proceniti u kom vremenskom periodu je došlo da dejstva stresora na organizam.

Postoji nekoliko mehanizama kako glukokortikosteroidi dospevaju u dlaku. Kortikosteroidi primarno prelaze difuzijom iz krvi u dlaku (Meyer i Novak, 2012), i na taj način prelazi slobodna frakcija kortikosteroida iz krvi u dlaku. Pored difuzije direktno iz krvi, pošto se folikuli dlake nalaze u neposrednoj blizini znojnih i lojnih žlezda, njihovi produkti direktno ulaze u folikule dlake ili se izlučuju na površinu kože i sa nje difunduju u dlaku (Harkey 1993; Gow i sar. 2010). Pored direktnog prelaska kortikosteroida u dlaku, moguća je i lokalna proizvodnja u samoj koži. U *in vitro* istraživanjima Ito i saradnici (2005) pokazali su da je moguća lokalna proizvodnja kortikosteroida, a takođe je utvrđeno i postojanja paralelnog CRH-ACTH-kortizol sistema u koži, uključujući epidermis, dermis i folikule dlake, nazvanog periferna HPA

osovina (Sharpley i sar. 2013). Postojanje ove periferne osovine kod ovaca u *in vivo* uslovima potvrdili su i Salaberger i saradnici (2016), gde su lokalno izlagali površinu kože iritirajućim agensima i utvrdili povećanje koncentracije kortizola u vuni na mestima izloženim stimulaciji.

Upotreba dlake kao biološkog materijala za procenu izloženosti hroničnom stresu značajna je iz razloga što je akumulacija kortikosteroida u dlaci bez uticaja cirkadijalnih varijacija. Aktivnost HPA osovine može se pratiti određivanjem koncentracije glukokortikosteroida u dlaci, što su pokazali González-de-la-Vara i saradnici (2011) aplikovanjem injekcija ACTH kod mlečnih krava gde su dobili značajno povećanje koncentracije kortizola u dlaci nakon 14 dana.

Uzorke dlake za određivanje koncentracije glukokortikosteroida najbolje je uzeti pomoću električnih šišača, neposredno uz površinu kože. Dobijeni uzorci mogu se čuvati na sobnoj temperaturi do izvođenja analiza jer temperatura ne utiče na koncentraciju kortizola u dlaci (Russell i sar. 2012). Bitno je da se uzorci dlake drže na tamnom, jer svetlost može da dovede do destrukcije glukokortikosteroida u dlaci (Roth i sar. 2016; Wester i sar. 2016).

Za određivanje koncentracije kortikosteroida u dlaci neophodno je izvršiti odgovarajuću pripremu. Priprema podrazumeva pranje, usitnjavanja i ekstrakciju kortikosteroida iz uzoraka. Uzorci se sečenjem na najsitnije delove ili pomoću kugličastog mlina usitnjavaju, s tim da se pri usitnjavanju kugličastim mlinom dobije prah iz koga se nakon ekstrakcije dobijaju značajno veće koncentracije kortikosteroida (Burnett i sar. 2014). Tako pripremljeni uzorci dlake peru se po odgovarajućim procedurama da se odstrani spoljašnja kontaminacija i prisustvio znoja i loja (Davenport i sar. 2006).

Vrednosti koncentracije kortizola u dlaci razlikuju se u literaturi. González-de-la-Vara i saradnici (2011) utvrdili su da je koncentracija kortizola u dlaci kod 15 dana starih ženskih teladi iznosila $114,5 \pm 14,43$ pg/mg dlake, dok su kod dve godine starih krava vrednosti koncentracije kortizola u dlaci bile značajno manje, $12,15 \pm 1,85$ pg/mg. Moya i saradnici (2013) utvrdili su da je koncentracija kortizola kod junadi bila od 0,30 do 5,31 pg/mg dlake, što je u skladu sa rezultatima za koncentraciju kortizola kod mlečnih krava, $2,5 \pm 0,10$ pg/mg dlake, objavljenih od strane Comin i saradnika (2011).

Boja dlake može imati uticaja na koncentraciju kortikosteroida u dlaci. Melanin kao glavni pigment u dlaci sintetišu melanociti pod dejstvom menalotropina koji nastaje iz proopiomelanokortina od koga nastaje i ACTH, tako da kontrola produkcije melanina i glukokortikosteroida dele iste mehanizme. Kako su glukokortikosteroidi uključeni u inhibiciju rasta dlake povezane sa stresom, kao i na razvoj i diferencijaciju melanocita, razlika u sadržaju glukokortikosteroida u različitim vrstama pigmentata u dlaci može biti povezana sa različitim kontrolnim mehanizmima. Pored toga, kako dlaka može biti mesto za skladištenje glukokortikosteroida, dlaka koja nema pigmenta ima više mesta za skladištenje glukokortikosteroida nego dlaka sa pigmentom (Benet i Hayysen, 2009).

Podaci u literaturi za vrednosti koncentracije kortizola u beloj i crnoj dlaci se razlikuju. Burnett i saradnici (2014) utvrdili su da je sadržaj kortizola kod mlečnih krava u crnoj dlaci bio značajno manji nego u beloj ($3,8 \pm 1,1$ pg/mg u crnoj dlaci $7,8 \pm 1,1$ pg/mg u beloj dlaci). Sa druge strane vrednosti koncentracije kortizola u beloj i crnoj dlaci koje su ustanovili Nejad i saradnici (2017) nisu se značajno razlikovale ($13,7 \pm 1,9$ pg/mg za crnu i $14,5 \pm 1,9$ pg/mg za belu dlaku), dok su Tallo-Para i saradnici (2015) utvrdili veću koncentraciju kortizola u crnoj ($3,9 \pm 1,44$ pg/mg) nego u beloj dlaci ($2,1 \pm 1,1$ pg/mg).

2.4. UZROČNICI STRESA

Postoje mnogobrojni uzročnici stresa kod životinja, ali svi oni se prema svome poreklu mogu podeliti na abiotičke i biotičke. Abiotički faktori su poreklom iz spoljašnje sredine i čine ih klimatski faktori, faktori koji su vezani za način držanja životinja i ishranu (Etim i Oguike, 2014). Biotički faktori vezani su za direktni uticaj bioloških agenasa na životinju i u njih se ubrajaju bakterijske i virusne infekcije kao i parazitske infestacije (Lozano, 1988).

2.4.1. Visoka spoljašnja temperatura kao stresogeni činilac

Faktori iz spoljašnje sredine, kao što su klimatski faktori, ishrana i način držanja, smatraju se glavnim stresogenim faktorima koji utiču na proizvodne sposobnosti i zdravlje životinja. Postoji veliki broj stresogenih klimatskih faktora kao što su toplota, hladnoća, vlažnost, vetar, koji mogu uticati na endokrini sistem i proizvodne karakteristike životinja. Međutim, od svih klimatskih faktora uticaj visoke spoljašnje

temperature, toplotni stres, ima najveći značaj (Bova i sar. 2014). Povećanje ambijentalne temperature više od 25 °C, odnosno 30 °C, pri optimalnoj ili povećanoj vlažnosti i pri odsutnosti kretanja vazduha dovodi kod goveda, pogotovo kod krava u laktaciji, do poremećaja zdravstvenog stanja, smanjenja apetita kao i pada proizvodnje mleka (Šamanc i Kirovski, 2008). Najprepoznatljiviji efekat toplotnog stresa jeste adaptivna depresija metabolizma povezana sa gubitkom apetita, tako da kod preživara toplotni stres brzo prelazi iz jednog neprijatnog iskustva u štetno delovanje na organizam (Etim i Oguike, 2014). Produženo izlaganje toplotnom stresu ima uticaja na koncentraciju određenih hormona kod mlečnih krava. Kod krava u laktaciji zapaža se pad koncentracije tireoidnih hormona u krvi (McGuire i sar. 1991), što može biti posledica prilagođavanja na visoku spoljašnju temperaturu ili odgovor na smanjenje apetita koje se kao odgovor organizma najranije javlja u uslovima toplotnog stresa. Niža koncentracija somatotropnog hormona i veća koncentracija insulinu sličnog faktora rasta-II smatraju se glavnom posledicom uticaja toplotnog stresa na unos hrane (McGuire i sar. 1991). U rezultatima Wise i saradnika (1988), krave držane u rashlađenim štalskim objektima imale su niže koncentracije serumskog kortizola u odnosu na one koje nisu bile zaštićene od previsoke temperature. Takođe, izlaganjem teladi toplotnom stresu, utvrđeno je da je došlo do povećanja koncentracije kortizola u krvi već nakon 20 minuta od uvođenja u toplotnu komoru, a najveća koncentracija je ustanovljena nakon četiri časa (Šamanc i Kirovski, 2008).

Na promenu koncentracije kortizola u krvi tokom izloženosti toplotnom stresu utiče i dužina izloženosti životinja stresnim uslovima. Kratkotrajno izlaganje krava toplotnom stresu dovodi do povećanja koncentracije serumskog kortizola, dok dugotrajno izlaganje dovodi do smanjenja koncentracije kortizola u krvi (Christison i Johnson, 1972; Du Preez, 2000). Smanjivanje lučenja kortizola i niža koncentracija u krvi kod dugotrajnog toplotnog opterećenja organizma sa fiziološke tačke gledišta može da se tumači kao jedan od mehanizama prilagođavanja na uslove povišene spoljašnje temperature, ali treba imati u vidu i to da glukokortikosteroidi, kao što je poznato, pojačavaju intenzitet kataboličkih procesa, što bi u uslovima produženog toplotnog stresa bilo nepotrebno za organizam.

2.4.2. Transport kao stresogeni činilac

Uticaj transportovanja na koncentraciju kortizola u krvnoj plazmi i aktivnost imunskog sistema kod goveda potvrdila su mnoga ispitivanja (Kent i Ewbank, 1986; Nanda i sar. 1989; Mackenzie i sar. 1997). Intenzitet odgovora kore nadbubrežne žlezde, odnosno stepen povećanja koncentracije kortizola zavisi od dužine trajanja i načina transportovanja, kao i uticaja drugih činilaca kao što su nedovoljno snabdevanje hranom i vodom ili uticaj visoke ili niske spoljašnje temperature. Prilikom transporta, od značaja za nastanak stresa i koncentraciju kortizola je i sam kvalitet puta kojim se životinje transportuju. U studiji gde su ovce transportovane po "krivudavom" i ravnom putu, Hall i saradnici (1997) su utvrdili značajno povećanje koncentracije kortizola u krvi kod ovaca transportovanih "krivudavim" putem u odnosu na ravan put.

Takođe, neki od ključnih faktora bitnih za dobrobit životinja tokom transporta, a samim tim i za nastanak stresa jesu i manipulacija sa životinjama, broj životinja (prenatranost), genetske predispozicije životinja i starost životinja (mešanje različitih starosnih kategorija) (Broom, 2003). Dužim transportovanjem životinja postepeno opada i aktivnost imunskog sistema, što omogućava prodor i brzo širenje mikroorganizama u organizmu. Tako je zapaženo da se u toku transportovanja ili neposredno nakon toga, kod teladi i junadi masovno javlja bolest respiratornog sistema ("transportna groznica") (Broom i Kirkden, 2004).

Transportovanje ima najjače delovanje na imunski sistem kod teladi u ranoj fazi života zbog nedovoljne zrelosti ovog sistema (Mackenzie i sar. 1997). Kod teladi, povišenje koncentracije kortizola kao odgovor organizma na delovanje stresogenih činilaca zavisi u velikoj meri od uzrasta. U uzrastu od tri meseca koncentracija kortizola u krvi posle transportovanja u trajanju od četiri i osamnaest časova je četiri puta veća nego kod teladi u uzrastu od tri nedelje, ali je značajno niža nego kod junadi u uzrastu od šest do osam meseci. Koncentracija kortizola u krvi teladi i junadi počinje da raste odmah posle uvođenja u vozilo pri čemu kod teladi u uzrastu od tri meseca dostiže najvišu vrednost u toku transportovanja (40 ng/ml). Posle četiri, odnosno osamnaest časova transportovanja, koncentracija kortizola u krvi kod teladi ovog uzrasta je bila niža u odnosu na najvišu utvrđenu vrednost, od 16 do 20 ng/ml (Kent i Ewbank, 1986). Kreuzer i saradnici (1998), utvrdili su da transportovanje i izvođenje mlečnih krava na planinske pašnjake na visini većoj od 2000 metara nadmorske visine predstavlja stres za

životinje. Isti autori preporučuju da se tokom transportovanja napravi pauza i u tom periodu životinjama da hrana i voda kako bi se ublažio uticaj transportnog stresa. Za preveniranje i smanjenje uticaja stresa nastalog tokom transporta, životinjama se preporučuje davanje vitamina C i E pre transportovanja, što je potvrđeno i u radu Kassab i Mohammed (2014), gde su ovce koje su dobile vitamin C pre transporta imale značajno manju koncentraciju kortizola u krvi nakon transporta nego netretirane životinje.

2.4.3. Način držanja i manipulacija sa životinjama kao stresogeni činilac

Jedan od najčešćih stresora koji se ujedno i najlakše eliminiše jeste nepravilno rukovanje sa teladima od strane radnika na farmama koje može imati za posledicu promene u ponašanju i stres kod mladih životinja (Webster, 1983). Ponašanje ljudi u velikoj meri izaziva reakcije životinja koje se doživljavaju kao pozitivna ili negativna iskustva. Neprijatna ponašanja ljudi kao što su, udaranje, vika i buka, pravljenje naglih pokreta u manipulaciji sa životinjama dovode do straha i pojave stresa kod životinja kao i promena u ponašanju. Životinje koje su izložene pozitivnim iskustvima, imaju značajno manji akutni odgovor kortizola na stresne činioce nego životinje koje su izložene negativnim iskustvima (Etim i Oguike, 2014). Kortizol je dobar indikator kratkotrajnog stresa koji nastaje kod goveda izloženih neprijatnim iskustvima prilikom manipulacije ili ograničenog kretanja. Međutim, pošto je koncentracija kortizola različita u odnosu na intenzitet stresora ona se može kod goveda podeliti u tri kategorije:

1) bazalna; 2) nivo koji se javlja prilikom ograničavanja kretanja životinje; i 3) nivo koji se javlja kod dejstva ekstremnih stresora (Grandin, 1997).

2.4.4. Hirurški tretman kao stresogeni činilac

Kod primene hirurških zahvata, kao i kod svih drugih stanja koja izazivaju bol, kao na primer, posle povreda delova tela ili prilikom teškog porođaja, nastaje odmah povećanje koncentracije ACTH u krvi, a zatim i povećanje koncentracije kortizola i beta-endorfina. Kod krava u laktaciji sa promenom položaja sirišta na levo koncentracija kortizola u krvnoj plazmi pre početka hirurškog zahvata i repozicije dislociranog organa je četiri puta niža nego posle hirurškog tretmana. Dva časa posle završenog tretmana koncentracija kortizola je bila ista ili nešto veća, da bi pet časova posle tretmana bila smanjena na polovinu od maksimalne vrednosti, a dvadeset četiri

časa posle se spustila i bila je nešto niže nego u trenutku pre hirurškog tretmana (Mudron i sar. 2005).

Obezrožavanje odraslih goveda je hirurška procedura koja uzrokuje stres različitog intenziteta, što se odražava na promene u ponašanju i promene nivoa kortizola u krvnoj plazmi. Prilikom obezrožavanja odraslih goveda, utvrđene su značajne razlike u koncentraciji kortizola u krvnoj plazmi između grupe goveda koja je bila sedirana intramuskularnom aplikacijom ksilazina u kombinaciji sa lokalnim anestetikom i grupe kojoj je bio aplikovan samo lokalni anestetik. U grupi goveda gde je kombinovana sedacija i lokalni anestetik postojao je značajno manji pik odgovora kortizola na obezrožavanje i značajno brže vraćanje vrednosti kortizola na bazalni nivo (Lepková i sar. 2007). Takođe, prilikom obezrožavanja teladi dolazi do povećanja koncentracije kortizola u plazmi, da bi se 3-4 časa nakon obezrožavanje njegova vrednost vratila na bazalni nivo. Zanimljivo je i da kod teladi kojima je aplikovan lokalni anestetik, pik koncentracije kortizola je bio manji ali su se prestankom dejstva anestetika njegove vrednosti povećale (Sylvester i sar. 1998).

2.4.5. Infekcija kao stresogeni činilac

Infekcija kao stresogeni činilac deluje tako da se na njenom početku povećava lučenje CRH, ACTH i kortizola. Porast koncentracije kortizola u krvnoj plazmi tokom infekcije deluje imunosupresivno, smanjujući proliferaciju limfocita i fagocitnu aktivnost neutrofilnih granulocita, što negativno utiče na odbrambenu sposobnost životinje (Roth i Kaeberle, 1993).

U ogledu koji su izveli Hopster i saradnici (1998), ustanovljeno je da među životinjama postoje one kod kojih promene kortizolemije nisu značajne, ali ima i onih, kod kojih je reakcija na stresogeno delovanje izazvano premeštanjem jedinki veoma izraženo, a koncentracija kortizola u krvnoj plazmi se za tri do pet puta poveća u odnosu na početne vrednosti. Jedan čas nakon nastanka stresne reakcije, odnosno premeštanja životinja, ustanovljeno je povećanje telesne temperature u proseku za oko 0,5 °C, kod grupe koja izraženo reaguje na stres. To nije ustanovljeno kod prve grupe životinja, odnosno grupe kod koje nije nastalo tako značajno povećanje koncentracije kortizola posle nastale stresne situacije. U ovom istom ogledu posle intramamarnog ubrizgavanja 10 µg endotoksina bakterija povećanje kortizolemije kod druge grupe je bilo približno isto kao i posle premeštanja, odnosno značajno veće nego kod grupe životinja koje nisu

tako drastično reagovale na stresogeno stanje. Tek posle pet časova, kod obe grupe životinja vrednosti kortizolemije su bile približno iste. Međutim, kod grupe životinja koja je podložnija delovanju stresogenih činilaca u toku ovog oglada je zapaženo značajno smanjenje broja limfocita u krvi koje je povremeno bilo veoma izraženo.

2.4.6. Ektoparaziti kao stresogeni činioci

Paraziti zajedno sa bakterijama i virusima čine glavne biotičke stresore kod životinja. Oni koriste hranljive materije domaćina za svoje potrebe i pri tome umanjuju dobrobit životinje (Lozano, 1988). Dele se na endoparazite, koji žive unutar domaćina, i ektoparazite, koji žive na domaćinu. Najčešći ektoparaziti koji se mogu naći kod goveda su insekti, a najbrojniji su muve koje sišu krv (*Stomoxysidae*), komarci (*Culicidae*), obadi (*Tabanidae*) i vaši (*Anoplura*). Ostale artropode, kao što su krpelji (*Ixodida*) i grinje (*Acarina*), su takođe zastupljeni (Christensen, 1982).

Prema navodima Campbel (1988), artropode izazivaju stres kod goveda koji može dovesti do smanjenja proizvodnih kapaciteta ovih životinja. Ektoparaziti kontinuirano grizu i uznemiravaju svoje domaćine izazivajući nemir, patnju i smanjenu proizvodnju mleka, što sve zajedno utiče negativno na dobrobit ovih životinja (Baldacchino i sar. 2013a; Lysyk, 2011; Taylor i sar. 2012). Oni negativno utiču i na ponašanje domaćina, aktivirajući reakcije kojima jedinka pokušava da se odbrani od njihovog uznemiravanja. Tako dolazi do intenzivnog pomeranja ušiju, glave, nogu i repa domaćina, kao i češanja kože. Pošto je životni ciklus ektoparazita uglavnom vezan za letnji period, sve ove negativne manifestacije njihovog prisustva često se udružuju sa efektima toplotnog stresa (Taylor i sar. 2012).

Stres izazvan ektoparazitima javlja se najčešće kod goveda na paši, ali i kod goveda u intenzivnom farmskom uzgoju tokom toplog perioda godine (Campbel, 1988).

Ektoparaziti, osim što imaju negativan uticaj na ponašanje životinja, dovode i do nekih promena fizioloških stanja, kao što je ubrzan rad srca, povećanje broja respiratornih pokreta i povećanje telesne temperature. Takođe, dolazi i do promena u nekim biohemijskim parametrima krvi, kao što je smanjenje koncentracije ukupnih proteina, albumina, glukoze i kalcijuma, a povećanje aktivnosti enzima kreatin kinaze (Bayford i sar. 1992; Tanritanir i sar. 2009). Sa aspekta stresa značajno je da je povećana i koncentracija kortizola kod goveda koja su izložena većoj infestaciji muvama (Bayford i sar. 1992).

Najznačajniji ekto parazit koji je prisutan na govedima jeste kosmopolitski rasprostranjena štalska muva, muva peckara, *Stomoxys calcitrans* (Mullens i sar. 2006). Ova muva se hvata za životinju, najčešće u predelu donjeg dela nogu ili predela vrata gde sisa krv od životinje 3-4 minuta, ali često u prekidima i menjajući mesto, uznemiravajući je i nanoseći joj konstantno bol (Showler i Osbrink, 2015). Značajno je i da infestacija ovim ekto parazitom osim nabrojanih neželjenih efekata dovodi i do smanjenja telesne mase kod junadi (Catangui i sar. 1997; Campbell i sar. 2001).

2.5. MERE ZAŠTITE ŽIVOTINJA OD EKTOPARAZITA KAO STRESOGENIH ČINILACA

Kako bi se smanjio negativni uticaj ekto parazita na goveda, pre svega na visokomlečne rase goveda u periodu laktacije, potrebno je sprovesti određene mere zaštite životinja od ekto parazita. Kako ni jedna pojedinačna metoda nije potpuno efikasna u kontroli ekto parazita postoji nekoliko strategija borbe protiv ekto parazita. To su sanitacija, mehanička zaštita, upotreba hemijskih sredstava za zaštitu životinja od ekto parazita i biološka zaštita (Bram, 1994; Baldacchino i sar. 2013b).

Sanitacija je jedna od najvažnijih metoda za smanjenje populacije štalskih muva. Osnovna uloga sanitacije jeste da se eliminišu uslovi za razmnožavanje insekata, što podrazumeva pre svega redovno čišćenje objekata u kojima se drže životinje, kao i odlaganje stajnjaka što dalje od farme (Baldacchino i sar. 2013b).

Mehanička zaštita podrazumeva upotrebu različitih zamki i zaštitnih mreža za kontrolu populacije pre svega štalskih muva. Ove zamke su često napravljene tako da privlače muve raznim mirisnim stimulusima ili bojom. Neke od najčešće korištenih zamki su lepljive trake, zamke koje privlače muve UV svetlom i uništavaju insekte elektromagnetnom energijom, kao i premazivanje površina plavom bojom i impregnisanje insekticidima (Taylor i Berkebile, 2006). Mehaničke mere zaštite od ekto parazita obično ne dovode do potpune zaštite životinja, zbog čega se kombinuju sa drugim merama, najčešće upotrebom anti ekto parazitskih sredstava (Baldacchino i sar. 2013b; Denning i sar. 2014).

Upotreba hemijskih sredstava u kontroli ekto parazita na farmama je široko rasprostranjena. Insekticidi koji se upotrebljavaju formulisani su kao sprejevi sa rezidualnim dejstvom kojima se najčešće prskaju zidovi objekata gde se skuplja najviše

ektoparazita. Međutim, ovaj rezidualni efekat najčešće se brzo gubi i nije dovoljan za sprečavanje širenja populacije ektoparazita, a sve je veća i pojava rezistencije štalskih muva na ova sredstva (Baldacchino i sar. 2013b). Iz ovih razloga, sve su više u upotrebi sredstva za individualni tretman životinja u cilju zaštite od ektoparazita. Zbog prednosti individualnog tretmana kao i zbog lake primene široko je prihvaćena upotreba *pour-on* antiectoparazitskih sredstava u kontroli infestacije ektoparazita kako na pašnjacima tako i u farmskim uslovima (Skogerboe i sar. 2000).

Biološka kontrola podrazumeva ulogu nekih *Hymenoptera* kao što su *Spalangia spp.* koje imaju visok potencijal za kontrolu populacije štalskih muva, uništavajući njihove larve (Skovgard i Steenberg, 2002). Ipak, upotreba biološke kontrole nije značajnije raširena u kontroli populacije ektoparazita kod goveda.

3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Cilj ove doktorske disertacije je bio da se ispita uticaj upotrebe antiektoparazitika na sprečavanje pojave hroničnog stresa, kroz određivanje koncentracija kortizola i kortikosterona u krvi, dlaci i mleku, kao i na proizvodne sposobnosti životinja, kroz određivanje količine proizvedenog mleka, sastava mleka i broja somatskih ćelija u mleku.

Da bi se ostvarili navedeni ciljevi postavljeni su sledeći istraživački zadaci:

1. Uzimanje uzoraka krvi, mleka i dlake od goveda rase holštajn i buša i određivanje bazalnih vrednosti kortizola
2. Izvođenje postupka validacija ELISA metode sa uzorcima dlake za određivanje koncentracije kortizola i kortikosterona
3. Identifikacija prisutnih ektoparazita u objektu za smeštaj holštajn krava tokom letnjeg perioda
4. Tretman odabrane grupe holštajn krava sa antiektoparazitikom 0., 28. i 56. dana oglada
5. Uzimanje uzoraka krvi, mleka i dlake 0., 21., 42., 63. i 84. dana oglada
6. Određivanje koncentracije kortizola i kortikosterona u krvi, mleku i dlaci kao i određivanje sadržaja pojedinih biohemijskih parametara u krvi i hemijskog sastava i broja somatskih ćelija u mleku iz svih uzetih uzoraka

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

Za utvrđivanje bazalnih vrednosti koncentracija kortizola u krvi, mleku i dlaci odabrane su krave, odnosno junice, holštajn i buša rase. Pri tome, za određivanje bazalnih vrednosti kortizola u krvi i dlaci odabrano je 25 jedinki holštajn rase (13 krava i 12 junica) kao i 24 jedinke buša rase (13 krava i 11 junica), dok su za određivanje bazalnih vrednosti koncentracija kortizola u mleku odabrane samo krave iz prethodnih grupa (13 krava rase holštajn i 13 krava rase buša).

Dodatno, za utvrđivanja značaja dlake kao indikatora stresa određena je razlika u koncentraciji kortizola između proksimalnog i distalnog dela dlake kod jedinki rase holštajn (12 junica i 13 krava iz prethodnih grupa) i jedinki rase buša (11 junica i 13 krava iz prethodnih grupa). Za ova ispitivanja je kod krava rase holštajn korišćena bela dlaka. Dodatno, da bi se utvrdilo da li kod jedinki rase holštajn postoji razlika u koncentraciji kortizola između dlake različitih boja, odabrano je drugih 12 holštajn krava i 12 junica iz prethodnih grupa sa iste farme i određena je koncentracija kortizola u crnoj i beloj dlaci, što nije urađeno kod krava i junica rase buša jer buše imaju samo jedan, "divlji" tip dlake. Takođe, poređena je koncentracija kortizola u opranim i neopranim uzorcima dlake kod junica rase holštajn (n=12), kao i kod junica rase buša (n=11) iz prethodnih grupa.

Nakon utvrđivanja bazalnih vrednosti koncentracije kortizola i utvrđivanja značaja dlake kao indikatora stresa, pristupilo se izvođenju oglada, koji je sproveden u cilju ispitivanja vrednosti indikatora stresa u uslovima tretmana antiektoparaziticima, a za koji je odabrano 26 krava holštajn rase.

Sve krave i junice rase buša uključena u navedena ispitivanja držane su u ekstenzivnim uslovima na području Stare planine u Republici Srbiji. Tokom celog dana buše su boravile na paši, sa kratkim boravkom u hladovini drveća tokom najtoplijeg dela dana, dok su tokom noći takođe ostajale na manjem ograđenom delu pašnjaka. Ishrana buša bila je zasnovana isključivo na dostupnoj paši, a pristup vodi bio je omogućen dva puta dnevno na pojilu. Krave rase buša su bile uzrasta od 4 do 8 godina i u periodu sredine laktacije, odnosno između 100 i 200 dana laktacije. Junice rase buša

bile su uzrasta između 12 i 20 meseci. Odabir jedinki za utvrđivanje bazalnih vrednosti kortizola u biološkim materijalima izvršen je početkom jula 2014. godine.

Sve krave i junice holštajn rase uključene u ova istraživanja držane su na farmi visoko-mlečnih krava u otvorenom sistemu sa objektima za smeštaj životinja koji su otvoreni sa tri strane i krovom koji je prekriven zaštitnim pločama bez termoizolacionog sloja. Krave su bile u slobodnom sistemu držanja. Prostirka na ležištima je prekrivena piljevinom. Farma se nalazi na području opštine Pelagićevo, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina, na 44⁰55'10" N geografske širine i 18⁰26'13" E geografske dužine u ravničarskoj regiji Posavina, delu Panonske nizije smeštenom između reka Bosne i Save. U navedenoj regiji vlada umereno kontinentalna klima sa toplim letima koja traju od jula do septembra meseca (Bušatlija, 2004). Obrok za krave i junice je bio prilagođen proizvodnoj kategoriji, a hranjenje je obavljano dva puta dnevno sa miksiranim obrokom (total mix ratio-TMR). Životinje su imale pristup vodi po volji. Muža se obavljala dva puta dnevno u grupnom izmuzištu tipa "Riblja kost". Merenje količine pomuženog mleka od svake krave sprovodilo se na dnevnom nivou preko mernog sistema za mužu *DeLaval* (Tumba, Švedska). Sve krave u ogledu su bile uzrasta od 4 do 8 godina. Odabrane krave su bile u periodu sredine laktacije, odnosno između 100 i 200 dana laktacije. Junice rasa holštajn bile su uzrasta između 12 i 20 meseci.

Ogled u okviru koga je ispitivana vrednost indikatora stresa u uslovima tretmana antiektoparaziticima je započet u letnjem periodu, 7. jula 2014. godine, kada su uzeti i uzorci za određivanje bazalnih vrednosti koncentracija kortizola. Ogled je trajao do 29. septembra iste godine. Izabrane krave su bile podeljene u dve grupe, netretiranu (n=13) i tretiranu (n=13). Tretirana grupa je držana u odvojenom boksu unutar istog objekta gde se nalazila i netretirana grupa krava. Zbog pojave bolesnih stanja, mastitisa, iz netretirane grupe je isključena jedna krava, dok su iz tretirane grupe isključene 3 krave, tako da je preostalo 12 krava u netretiranoj i 10 krava u tretiranoj grupi.

4.2. TRETMAN

Ispitivanje vrednosti indikatora stresa u uslovima tretmana antiektoparaziticima vršeno je u letnjem periodu zbog značajnog prisustva ektoparazita, kako na životinjama tako i na unutrašnjim površinama objekta gde su životinje boravile. Pre izvođenja ogleda zastupljenost ektoparazita na životinjama utvrđena je vizuelizacijom celog tela

životinje, pri čemu je utvrđeno značajno prisustvo muva, posebno u predelu donjeg dela nogu, oko vrata i leđa. Zastupljenost ektoparazita na životinjama i u objektu dokumentovana je kroz fotografije (Slika 5). Ektoparaziti prisutni u objektu za vreme izvođenja oglada su sakupljeni za identifikaciju pomoću zamki koje privlače ektoparazite mirisnim materijama. Uхваćeni ektoparaziti su čuvani u 80% etanolu. Identifikacija ektoparazita izvršena je u Institutu za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu, gde je utvrđeno da se radilo o kosmopolitski rasprostranjenoj štalskoj muvi, muva peckara, *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758).

Slika 5. Zastupljenost muva na telu životinja



Na slici 5 je prikazana zastupljenost muva (*Stomoxys calcitrans*) na donjem delu nogu i leđima

Tretman krava antiectoparaziticima je sproveden na 10 krava holštajn rase koje su pripadale tretiranoj grupi. Preostalih 12 krava holštajn rase je pripadalo grupi koja nije tretirana. Za tretman je upotrebljen rastvor za polivanje po koži iz grupe piretroida, *ciflutrin*, pod nazivom Bayofly Pour-on (Bayer, Berlin, Nemačka). Sredstvo je antiectoparazitik za lokalnu primenu. Prvi tretman je izveden 7. jula (nulti dan uzorkovanja) prema uputstvu proizvođača polivanjem duž leđa od plečki do korena repa sa po 10 ml Bayofly-a, što odgovara dozi od 0,2 mg ciflutrina/kg telesne mase za goveče od 500 kg. Prema uputstvu proizvođača, tretman je ponovljen na isti način nakon 28 i 56 dana od prvog tretmana.

4.3. UZIMANJE UZORAKA KRVI

Za određivanje bazalnih vrednosti koncentracija kortizola uzorci su uzeti od svih životinja u jutarnjim časovima, odnosno neposredno pre muže kod krava holštajn rase, a pre izlaska životinja na otvorene pašnjake kod jedinki rase buša.

Za određivanje koncentracija indikatora stresa u uslovima tretmana antiektoparaziticima, uzorci krvi krava tretirane i netretirane grupe su uzimani 0., 21., 42., 63. i 84. dana oglada, što su bili periodi P0, P1, P2, P3 i P4.

Uzorci krvi od svih životinja uzeti su punkcijom *v. jugularis*. Nakon toga uzorci su ostavljeni u sterilnim vakutajnerima bez antikoagulansa u količini od po 10 ml, ne duže od 30 minuta na sobnoj temperaturi da bi se izvršila spontana koagulacija. Centrifugiranje je izvršeno na 3000 obrtaja/min tokom 10 minuta u cilju izdvajanja seruma. Dobijeni krvni serumi su čuvani na -20°C do izvođenja analiza.

4.4. UZIMANJE UZORAKA MLEKA

Za utvrđivanje bazalnih vrednosti kortizola uzeti su uzorci mleka tokom jutarnje muže kod krava rase holštajn, odnosno uzorci dobijeni ručnim izmuzavanjem mleka neposredno nakon uzorkovanja krvi kod krava rase buša, uzimajući u obzir činjenicu da se krave rase buša nisu izmuzavale, već je mleko korišćeno isključivo za potrebe teladi koja su sisala majke. Od krava rase holštajn, uzorci mleka su uzeti pomoću sabirnika za dobijanje reprezentativnih uzoraka mleka postavljenih na sistem za mužu *DeLaval* (Tumba, Švedska).

Za određivanje koncentracija indikatora stresa u uslovima tretmana antiektoparaziticima, ali i određivanje hemijskog sastava i broja somatskih ćelija u mleku, uzorci mleka od tretiranih i netretiranih krava uzeti su 0., 21., 42., 63. i 84. dana oglada, odnosno u periodima P0, P1, P2, P3 i P4, u kojima su uzimani i uzorci krvi.

Uzroci mleka svih krava korišćeni za određivanje koncentracije ispitivanih hormona uzeti su u obeležene plastične bočice u količini od po 50 ml od svake krave i čuvani su na -20°C do izvođenja analiza.

Uzorci mleka korišćeni za određivanje hemijskog sastava i broja somatskih ćelija (uzorci krava rase holštajn) uzeti su u količini od po 50 ml u bočice sa

konzervansom azidiolom i transportovane su odmah do laboratorije na temperaturi od +4 °C.

4.5. UZIMANJE UZORAKA DLAKE

Za utvrđivanje bazalnih vrednosti koncentracije kortizola u dlaci izabranih životinja, uzorkovanje je izvršeno u predelu sredine repa.

Za određivanje koncentracija indikatora stresa u uslovima tretmana antiektoparaziticima, uzorci bele dlake su uzeti 0., 21., 42., 63. i 84. dana oglada, odnosno u periodima P0, P1, P2, P3 i P4, u kojima su uzimani i uzorci krvi i mleka, takođe u predelu sredine repa.

Od svih životinja uzeto je po 0,5 g dlake pomoću električnog šišača, neposredno uz površinu kože. Neposredno nakon šišanja, uzorci bele dlake su podeljeni makazama na dva dela, proksimalni (bliži površini kože) i distalni (dalji od površine kože). Crna dlaka nije deljena jer je bila znatno kraća.

Uzorci dlake su čuvani u obeleženim plastičnim zip kesicama na -20 °C do izvođenja analiza.

4.6. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE KORTIZOLA I KORTIKOSTERONA

4.6.1. Određivanje kortizola i kortikosterona u krvi

U svim uzorcima krvnih seruma određena je koncentracija kortizola, a u uzorcima od netretirane i tretirane grupe krava određena je i koncentracija kortikosterona.

Koncentracija kortizola u krvnim serumima određena je radioimunološkom (RIA) analizom na Institutu za nuklearne nauke „Vinča”. Za određivanje koncentracije kortizola je upotrebljen komercijalni RIA kortizol (CT) kit, proizvođača INEP (Zemun, Srbija). *Intraassay* CV za koncentraciju kortizola u krvi iznosio je 5%, dok je za *interassay* iznosio 10%.

Koncentracija kortikosterona u serumu određena je imunoenzimskom (ELISA) metodom na Institutu za predkliničke nauke, Veterinarskog fakulteta Univerziteta u Ljubljani. Za određivanje koncentracije kortikosterona upotrebljen je komercijalni

ELISA kit za kortikosteron (Demeditec, Kiel, Nemačka). Za koncentraciju kortikosterona u krvi *intraassay* i *interassay* CV su bili 7,2% i 12,2%, redom.

4.6.2. Određivanje kortizola i kortikosterona u mleku

Pre određivanja koncentracije kortizola i kortikosterona u mleku izvršena je priprema uzoraka. Uzorci mleka su stavljeni u vodeno kupatilo na 37 °C da bi se odmrznuli. Nakon odmrzavanja, uzorci mleka su homogenizovani upotrebom vorteks mešalice. Od svakog uzorka je odvojeno po 10 ml homogenizovanog mleka u staklene epruvete i centrifugovano na 2500 obrtaja u minuti tokom 20 minuta da bi se izdvojila mlečna mast na površini. Mlečna mast je zatim odvojena pomoću vakum pumpe. Uzorcima je dodato po nekoliko kapi sirila (Sirela, Čačak, Srbija) i inkubirani su na 37 °C tokom 20 minuta da bi došlo do koagulacije kazeina u mleku, a zatim su centrifugovani na 2500 obrtaja u minuti tokom 15 minuta da bi se odvojio mlečni serum. Dobijeni mlečni serum su odvojeni u obeležene bočice. Po 0,5 ml mlečnog seruma je prebačeno u bočice i sušeno pomoću azotnog isparivača do potpunog isušivanja. U bočice sa osušenim mlečnim serumom dodato je po 125 µl rastvora fosfatnog pufera (PBS) i homogenizacija je vršena uz upotrebu vorteksa do potpunog rastvaranja osušenog seruma. Dobijeni ekstrakt čuvan ja na -20 °C do određivanja koncentracije glukokortikosteroida u mleku.

U svim uzorcima koncentracija kortizola u mleku je određena RIA metodom, pomoću istog komercijalnog RIA kortizol (CT) kita koji je korišten i za određivanje kortizola u krvnom serumu. Koncentracija kortikosterona određena je u mleku kod netretirane i tretirane grupe holštajn krava imunoenzimskim metodom, pomoću komercijalnog ELISA kita za kortikosteron (Demeditec, Kiel, Nemačka). Za metodu detekcije kortizola u mleku *intraassay* i *interassay* CV su bili 5,0% i 10,0% redom, a za kortikosteron 7,2% i 12,2%.

4.6.3. Određivanje kortizola i kortikosterona u dlaci

Pre određivanja koncentracije kortizola i kortikosterona, uzorci dlake su pripremljeni na odgovarajući način. Približno 0,2 g dlake je stavljeno u tečni azot 10 sekundi da bi dlaka očvrtnula, a zatim su uzorci dlake prebačeni u mesingane komore sa kuglicama i samleveni tokom 5 minuta na 1500 obrtaja u minuti pomoću Milmix 20

kugličastog mlina (Tehtnica, Železniki, Slovenija). Prosečna veličina dobijenih čestica praha samlevene dlake bila je 215 μm . U samlevene uzorke dlake u količini od po 0,1 g dodato je po 0,6 ml metanola (Merck, Nju Džerzi, SAD) i 0,5 ml bidestilovane vode i ekstrakcija je izvedena mešanjem na 500 obrtaja tokom 30 minuta. Nakon ekstrakcije mešavina je centrifugovana na 2500 obrtaja tokom 20 minuta i dobijeni supernatant je odliven u polipropilenske bočice i čuvan na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do izvođenja analiza.

Za dodatno utvrđivanja razlike u koncentracije kortizola u neopranim i opranim uzorcima dlake, sa uzorcima dlake junica holštajn i buša rase izvedena je i dodatna procedura pranja uzoraka dlake. Približno 0,2 g dlake je stavljeno u plastične tube i dodato je 3 ml izopropanola (Carlo Erba, Milano, Italija). Tube su dobro zatvorene sa poklopcem i snažno izmešane na mešalici na 300 obrtaja u minuti tokom 3 minuta. Izopropanol je nakon toga odliven i procedura pranja je ponovljena još jednom. Uzorci dlake su zatim prenešeni u staklene epruvete i sušeni na $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ tokom 2 sata. Procedura mlevenja i ekstrakcije je zatim izvršena na isti način kao i za neoprano dlaku.

Koncentracije kortizola u ekstraktima iz uzoraka dlake određena je upotrebom komercijalnog ELISA kita za kortizol (Demeditec, Kiel, Nemačka), prema uputstvu proizvođača. Određivanje koncentracije kortikosterona u ekstraktima uzoraka dlake odrađeno je upotrebom komercijalnog ELISA kita za kortikosteron (Demeditec, Kiel, Nemačka), prema uputstvu proizvođača. Očitavanje apsorbanci je izvršeno na čitaču mikrotitar ploča Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD), na talasnoj dužini od 450 nm. Kako su upotrebljeni ELISA testovi validirani od strane proizvođača samo za određivanje kortizola i kortikosterona u serumu ili plazmi, bilo je neophodno uraditi njihovu validaciju za određivanje kortizola i kortikosterona u dlaci.

4.6.3.1. Validacija ELISA metode za određivanje koncentracije kortizola i kortikosterona u dlaci

Dobijanje tačnih i pouzdanih podataka jedan je od ključnih faktora za uspešnu primenu određene analitičke metode. Ispunjavanje ovih uslova obezbeđuje se pomoću validacije metode koja se definiše kao postupak kojim se ispituje određena analitička metoda u cilju utvrđivanja njene pouzdanosti za određenu primenu.

Za proces validacije uzeti su uzorci dlake koji su imali relativno visoku i nisku koncentraciju kortizola i kortikosterona pri određivanju ELISA metodom. Parametri validacije koji su određivani su: senzitivnost, specifičnost, preciznost i *recovery*

vrednost (određivanje procenata prinosa). Senzitivnost i specifičnost su bile definisane samim testom od strane proizvođača te su vrednosti samo računski prilagođene za izražavanje u ng/g dlake. Preciznost testa određena je merenjem istih uzoraka više puta u istom testu i na taj način je određen koeficijent varijacije unutar testa (*intrassay CV*). Isti uzorci koji su izmereni za određivanje *intrassay CV*, izmereni su sa istim ELISA kitom ali iz druge serije i dobijene razlike u merenjima između dva kita su predstavljene kao koeficijent varijacije između testova (*interassay CV*). *Recovery* vrednost određena je tako što je u uzorke dlake dodata poznata koncentracija standarda kortizola i kortikosterona (Sigma–Aldrich, St. Luis, Misuri, SAD) i izvršeno je određivanje koncentracije u više ponavljanja. Test je određen sa dodatkom dve koncentracije standarda kortizola i to od 250 i 125 ng/g dlake i dve koncentracije standarda kortikosterona i to od 125 i 62 ng/g dlake. Nakon određivanja upoređene su dobijene vrednosti sa očekivanim i izračunata je *recovery* vrednost.

Rezultati validacije prikazani su u poglavlju Rezultati.

4.6.4. Određivanje koncentracije biohemijskih parametara u krvi

U svim uzorcima krvnih seruma ogleđnih krava određena je koncentracija glukoze, ukupnih proteina, albumina, globulina, ukupnog bilirubina, uree, kao i aktivnost enzima kreatin kinaze (CK) i alkalne fosfataze (ALP). Koncentracija glukoze određena je iz pune krvi odmah nakon uzimanja na aparatu Precision Xceed (Abbott, Witney Oxon, Velika Britanija), uz upotrebu odgovarajućih test traka od istog proizvođača. Koncentracija ukupnih proteina, albumina, globulina, ukupnog bilirubina, uree, kao i aktivnost enzima CK i ALP određena je na biohemijskom analajzeru VetTest Chemistry Analyzer Version 8.22A (IDEXX, Westbrook, SAD) na principu fotometrije (merenje intenziteta promene boje), upotrebom pojedinačnih testova od istog proizvođača za svaki parametar.

4.6.5. Određivanje hemijskog sastava i broja somatskih ćelija u mleku

Najviše 4 sata nakon uzimanja mleka, u uzorcima je određen procentualni sadržaj mlečne masti (% mm), proteina (% prot), laktoze (% lakt), suve materije (% SM), suve materije bez masti (% SMBM) i broj somatskih ćelija u ml mleka (BSC^ć). Određivanje hemijskog sastava mleka određeno je na principu infracrvene spektrofotometrije na aparatu MilkoScan FC 6000 (FOSS, Hilleroed, Danska). Broj

somatskih ćelija određen je metodom protočne citometrije na aparatu CombiFoss 6000 (FOSS, Hilleroed, Danska).

4.7. STATISTIČKA ANALIZA

Svi podaci su analizirani pomoću komercijalnog programa za statističku obradu podataka STATISTICA v. 8. (StatSoft , Inc., Tulsa, OK, SAD). Normalnost raspodele podataka testirana je pomoću Shapiro-Wilk W testa, gde rezultati sa nivoom značajnosti $p < 0,05$ nisu imali normalnu raspodelu.

Za podatke koji su imali normalnu raspodelu, vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška, a za podatke koji nisu imali normalnu raspodelu vrednosti su predstavljene su kao medijana, gornji kvartil i donji kvartil.

Testiranje značajnosti razlika vrednosti između grupa koje nisu imale normalnu raspodelu (koncentracija kortizola u krvi kod određivanja bazalnih vrednosti i koncentracija kortizola i kortikosterona u mleku kod netretirane i tretirane grupe) vršeno je neparametrijskim Kruskal-Wallis ANOVA testom, a zatim Mann-Whitney U *post hoc* testom. Za poređenja podataka unutar grupa koji nisu imali normalnu raspodelu upotrebljen je Wilcoxon match pairs test.

Testiranje značajnosti razlika vrednosti između grupa koje su imale normalnu raspodelu vršeno je pomoću faktorijalne analize varijanse (eng. Factorial ANOVA), uz upotrebu *t*-testa, kao *post hoc* testa. Za poređenje koncentracija između različitih grupa upotrebljen je *t*-test za nezavisne uzorke dok je za poređenje koncentracija unutar grupa (proksimalnog i distalnog segmenta dlake, bele i crne dlake, oprane i neoprane dlake) upotrebljen *t*-test za zavisne uzorke. Koeficijenti korelacije određeni su između različitih bioloških materijala kod oglednih krava za koncentracije kortizola i kortikosterona kao i u istim biološkim materijalima između koncentracije kortizola i kortikosterona.

Za statistički značajnu razliku uzimana je vrednost $p < 0,05$, $p < 0,01$ i $p < 0,001$.

5. REZULTATI

U rezultatima su najpre prikazani rezultati validacije ELISA metode za određivanje koncentracije kortizola i kortikosterona u dlaci, a zatim bazalne vrednosti koncentracija kortizola u krvi, mleku i dlaci. Nakon toga prikazane su razlike u vrednostima odabranih indikatora stresa između tretiranih i netretiranih krava, pojedinačno u krvi, mleku i dlaci. Dodatno je ispitana korelacija između pojedinih indikatora stresa određenih u pojedinim biološkim materijalima. Da bi se utvrdio uticaj stresa na celokupan metabolički status jedinke, ispitani su mlečnost, odnosno biohemijski sastav krvi i mleka tretiranih i netretiranih krava.

5.1. VALIDACIJA ELISA METODE ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE KORTIZOLA U DLACI

Svaki pojedinačni parametar validacije (senzitivnost, specifičnost, preciznost i *recovery*) prikazan je u okviru posebnog podpoglavlja.

5.1.1. Senzitivnost i specifičnost testa

Senzitivnost testa, odnosno najniža vrednost koncentracije kortizola koja se može detektovati upotrebljenim ELISA kitom definisana je od strane proizvođača za serum ili plazmu i iznosi 2,5 ng/ml. Kod ekstrakcije kortizola iz dlake upotrebljeno je 0,1 g dlake, čime je dobijen rezultat izražen u ng/ml ekstrakta. Da bi se dobila vrednost koja se odnosi na koncentraciju kortizola u 1 g dlake, dobijenu vrednost treba pomnožiti sa 10. Zbog toga je senzitivnost testa za određivanje kortizola u dlaci 25 ng/g.

Specifičnost testa predstavlja sposobnost analitičke metode da razlikuje analit koji treba da se odredi od drugih supstanci prisutnih u uzorku. Specifičnost upotrebljenog testa je definisana od strane proizvođača i vrednosti unakrsne reaktivnosti prikazane su u tabeli 1.

Tabela 1. Specifičnost testa za kortizol

Steroid	Unakrsna reaktivnost (%)
Kortizol	100
Kortikosteron	45
Progesteron	< 9
Deoksikortizol	< 2
Deksametazon	< 2
Estriol	< 0,01
Estron	< 0,01
Testosteron	< 0,01

5.1.2. Preciznost testa

Preciznost testa je određena ponovljenim određivanjem koncentracija kortizola u dva uzorka od kojih je jedan imao relativno visoku, a drugi relativno nisku koncentraciju. Na osnovu toga izračunat je koeficijent varijacije (CV) u istom testu, odnosno istoj mikrotitarskoj ploči (intraassay CV) i između testova odnosno na različitim mikrotitarskim pločama (interassay CV).

$$CV = (SD / \text{srednja vrednost}) \times 100$$

Intraassay CV utvrđen je upotrebom 20 ponavljanja na istoj mikrotitarskoj ploči za uzorak sa najvišom i uzorak sa najnižom koncentracijom (tabela 2).

Tabela 2. Intraassay CV (kortizol)

Uzorak	n	X (ng/g)	Intraassay CV (%)
1	20	272	7,68
2	20	147	7,49

n-broj ponavljanja; *X*-srednja vrednost

Interassay CV utvrđen je korišćenjem istih uzoraka u 3 ponavljanja na istoj mikrotitarskoj ploči uz upotrebu 5 različitih mikrotitarskih ploča. Rezultati su prikazani u tabeli 3.

Tabela 3. Interassay CV (kortizol)

Uzorak	n	X (ng/g)	Interassay CV (%)
1	15	258	8,93
2	15	140	7,90

n-broj ponavljanja; *X*-srednja vrednost

5.1.3. Recovery vrednost (Određivanje procenta prinosa)

Recovery vrednost određena je tako što se dlaci u kojoj je poznata koncentracija kortizola, tj. prethodno izmerenoj vrednosti (u našem slučaju je izmerena vrednost bila 140 ng/g) doda poznata koncentracija kortizola (Hydrocortisone, Sigma – Aldrich, St. Louis, SAD), nakon čega se izvrši ekstrakcija, a zatim ponovo odredi koncentracija kortizola. Nakon toga se dobijena vrednost uporedi sa očekivanom. Recovery vrednost se izračunava po formuli:

$$R = (\text{izmerena vrednost} / \text{očekivana vrednost}) \times 100$$

Recovery vrednosti prikazane su u tabeli 4.

Tabela 4. *Recovery* vrednost nakon dodavanja kortizola uzorcima dlake

Dodata koncentracija (ng/g)	n	Očekivani rezultat (ng/g)	Dobijeni rezultat (ng/g)	<i>Recovery</i> (%)
250	6	390	484	124
125	6	265	268	101

n-broj ponavljanja

5.2. VALIDACIJA ELISA METODE ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE KORTIKOSTERONA U DLACI

5.2.1. Senzitivnost i specifičnost testa

Senzitivnost testa, odnosno najniža vrednost koncentracije kortikosterona koja se može detektovati upotrebljenim ELISA kitom dobijena je mešanjem standardnih rastvora 0,00 ng/ml i 1,73 ng/ml iz originalnog pakovanja u razmeri 1:1. Tako je dobijen standardni rastvor koji je pored ostalih standardnih rastvora upotrebljen za određivanje kalibracione krive, te je na taj način senzitivnost testa snižena na 0,86 ng/ml. Pošto je upotrebljeno 0,1 g dlake za ekstrakciju (isto kao kod kortizola), kada se ta vrednost pomnoži sa 10 dobije se vrednost od 8,6 ng/g dlake što predstavlja senzitivnost testa za određivanje kortikosterona u dlaci.

Specifičnost testa, odnosno sposobnost analitičke metode da razlikuje analit koji treba da se odredi od drugih supstanci prisutnih u uzorku, definisana je od strane proizvođača i vrednosti unakrsne reaktivnosti prikazane su u tabeli 5.

Tabela 5. Specifičnost testa za kortikosteron

Steroid	Unakrsna reaktivnost (%)
Kortikosteron	100
Progesteron	7,4
Deoksikortikosteron	3,4
11-dehidrokortikosteron	1,6
Kortizol	0,3
Pregnenolon	0,3

5.2.2. Preciznost testa

Preciznost testa je određena ponovljenim određivanjem kortikosterona u dva uzorka od kojih je jedan imao relativno nisku, a drugi relativno visoku koncentraciju. Na osnovu toga izračunat je koeficient varijacije (CV) u istom testu, odnosno istoj

mikrotitarskoj ploči (intraassay CV) i između testova odnosno na različitim mikrotitarskim pločama (interassay CV).

Intraassay CV utvrđen je upotrebom 20 ponavljanja na istoj mikrotitarskoj ploči za uzorak sa relativno visokom i uzorak sa relativno niskom koncentracijom (tabeli 6).

Tabela 6. Intraassay CV (kortikosteron)

Uzorak	n	X (ng/g)	Intraassay CV (%)
1	20	48,50	9,10
2	20	27,70	8,42

n-broj ponavljanja; *X*-srednja vrednost

Interassay CV utvrđen je korišćenjem istih uzoraka u 3 ponavljanja na istoj mikrotitarskoj ploči uz upotrebu 5 različitih mikrotitarskih ploča. Rezultati su prikazani u tabeli 7.

Tabela 7. Interassay CV (kortikosteron)

Uzorak	n	X (ng/g)	Interassay CV (%)
1	15	45,00	11,24
2	15	24,80	12,60

n-broj ponavljanja

5.2.3. Recovery vrednost (Određivanje procenta prinosa)

Recovery vrednost određena je na isti način kao i za kortizol, tako što se dlaci u kojoj je poznata koncentracija kortikosterona, tj. prethodno izmerenoj vrednosti (u našem slučaju je izmerena vrednost bila 40 ng/g) doda poznata koncentracija kortikosterona, nakon čega se izvrši ekstrakcija, a zatim ponovo odredi koncentracija kortikosterona. Nakon toga se dobijena vrednost uporedi sa očekivanom. Recovery vrednost se izračunava po istoj formuli kao i za kortizol.

$$R = (\text{izmerena vrednost} / \text{očekivana vrednost}) \times 100$$

Recovery vrednosti prikazane su u tabeli 8.

Tabela 8. Recovery vrednosti nakon dodavanja kortikosterona uzorcima dlake

Dodata koncentracija (ng/g)	n	Očekivani rezultat (ng/g)	Dobijeni rezultat (ng/g)	Recovery (%)
125	6	165	185	112
62	6	102	92	90

n-broj ponavljanja

5.3. BAZALNE VREDNOSTI KONCENTRACIJA KORTIZOLA U KRVI, MLEKU I DLACI

5.3.1. Bazalne vrednosti koncentracija kortizola u krvi

Rezultati koncentracije kortizola u krvi kod goveda holštajn i buša rase prikazani su u tabeli 9.

Tabela 9. Koncentracija kortizola u krvi kod holštajn i buša rase goveda (ng/ml)

	holštajn krave (n=13)	buša krave (n=13)	holštajn junice (n=12)	buša junice (n=11)
X	10,07 ^A	4,15 ^B	7,80 ^a	3,41 ^b
SE	2,07	0,54	1,45	0,76
IV	4,22 - 26,4	0,38 - 6,43	2,39 - 15,83	0,54 - 7,22
Me	6,40	4,81	5,95	3,97
Lq	5,70	4,02	3,59	0,83
Uq	9,33	5,56	12,46	6,40

X-srednja vrednost; *SE*-standardna greška; *IV*- interval varijacije *M_e* - mediana; *LQ* - donji kvartil; *UQ* - gornji kvartil

^{a,b} - Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između grupa ($p < 0,05$)

^{A,B} - Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između grupa ($p < 0,01$)

Iz tabele 9 se zapaža da su goveda rase holštajn imala statistički značajno veću koncentraciju kortizola u krvi u odnosu na goveda rase buša ($p < 0,01$ za krave i $p < 0,05$ za junice). Između krava i junica unutar istih rasa nije bilo statistički značajne razlike.

5.3.2. Bazalne vrednosti koncentracija kortizola u mleku

Rezultati koncentracije kortizola u mleku između krava rase holštajn i buša prikazani su u tabeli 10.

Tabela 10. Koncentracija kortizola u mleku (ng/ml)

	holštajn krave (n=13)	buša krave (n=13)
X	0,24 ^a	0,17 ^b
SE	0,02	0,02
IV	0,15 - 0,37	0,04 - 0,26

X-srednja vrednost; *SE*-standardna greška; *IV*- interval varijacije

^{a,b} - Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između grupa ($p < 0,05$)

Iz tabele 10 se zapaža da su krave holštajn rase imale statistički značajno veću koncentraciju kortizola u mleku u odnosu na krave buša rase ($p < 0,05$).

5.3.3. Bazalne vrednosti koncentracija kortizola u dlaci

5.3.3.1. Poređenje koncentracija u različitim segmenatima dlake

U tabeli 11 prikazano je poređenje koncentracije kortizola između proksimalnih i distalnih segmenata dlake kod svih goveda. Takođe, prikazano je i poređenje koncentracije kortizola između istih segmenata dlake kod krava i junica iste rase, kao i poređenje između različitih rasa.

Tabela 11. Poređenje koncentracije kortizola u dlaci kod goveda rasa holštajn i buša

Koncentracija kortizola u dlaci (ng/g)		
holštajn krave (n=13)	Proksimalni deo	Distalni deo
X	233,92 ^{Aa}	229,00 ^{Aa}
SE	16,78	18,59
IV	103,00 - 293,00	80,00 - 313,00
holštajn junice (n=12)		
X	217,22 ^{Aa}	190,00 ^{Aa}
SE	20,52	29,39
IV	150,00 - 342,00	61,00 - 320,00
buša krave (n=13)		
X	188,85^{Ba}	168,65^{Bb}
SE	13,52	13,27
IV	109,00 - 300,00	95,50 - 275,50
buša junice (n=11)		
X	120,54^{Ca}	100,91^{Cb}
SE	9,54	37,81
IV	67,00 - 166,00	24,00 - 161,00

X-srednja vrednost; SE-standardna greška; IV- interval varijacije

^{A,B,C} - Vrednosti u istoj koloni sa različitim slovima označavaju statistički značajnu razliku između grupa

^{a,b} - Vrednosti u istom redu sa različitim slovima označavaju statistički značajnu razliku između segmenata

Koncentracija kortizola u dlaci kod krava holštajn rase bila je statistički značajno veća u odnosu na krave rase buša poređenjem u oba segmenta, proksimalnom i distalnom ($p < 0,05$ i $p < 0,01$ redom). U dlaci kod junica holštajn rase, koncentracija kortizola je takođe bila značajno veća u oba segmenta u odnosu na junice rase buša u ista dva segmenta, ($p < 0,01$ za proksimalni i $p < 0,01$ za distalni segment). Kod goveda rase holštajn, nije postojala značajna razlika u koncentraciji kortizola u dlaci između krava i junica ni u jednom segmentu dlake. Kod goveda rase buša, koncentracija

kortizola u dlaci kod krava je bila značajno veća nego kod junica i u proksimalnom i u distalnom segmentu, ($p < 0,01$, za oba segmenta). Koncentracija kortizola između proksimalnih i distalnih segmenata dlake nije se razlikovala ni kod krava ni kod junica holštajn rase. Za razliku od holštajn rase, kod krava i junica rase buša postojala je značajno viša koncentracija kortizola u proksimalnom u odnosu na distalni segment dlake ($p < 0,01$ i $p < 0,05$, redom) (Tabela 11).

5.3.3.2. Poređenje koncentracije kortizola u uzorcima dlake različitih boja

Poređenjem uzoraka bele i crne dlake nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji kortizola (tabela 12).

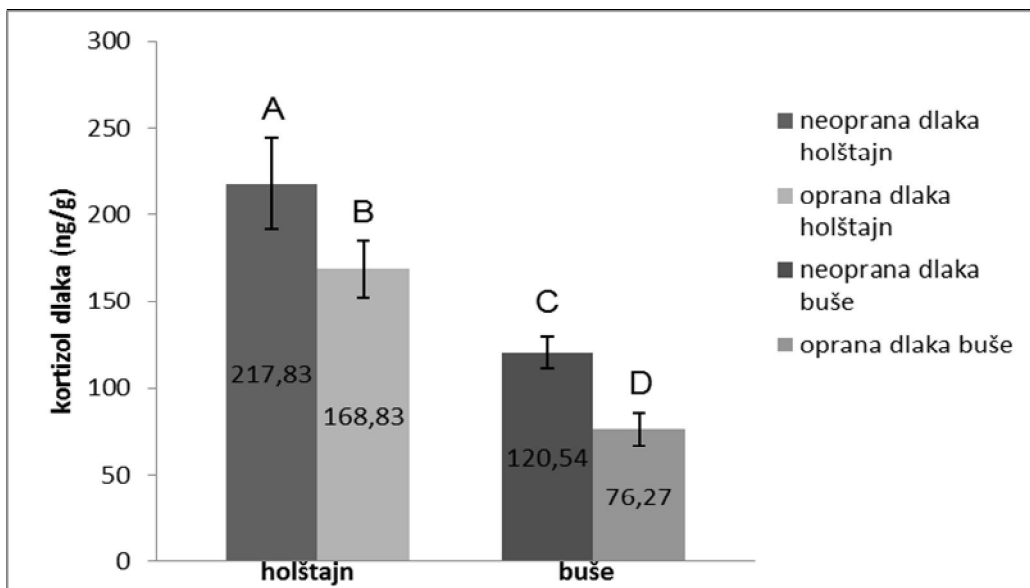
Tabela 12. Poređenje koncentracije kortizola između bele i crne dlake kod krava i junica rase holštajn

Koncentracija kortizola u dlaci (ng/g)		
holštajn krave (n=12)	Bela dlaka	Crna dlaka
X	172,58 ^a	189,42 ^a
SE	24,47	25,76
IV	64,00 - 332,00	87,00 - 358,00
holštajn junice (n=12)	Bela dlaka	Crna dlaka
X	203,6 ^a	224,22 ^a
SE	22,35	16,58
IV	128,50 - 331,00	129,00 - 297,00

X-srednja vrednost; SE-standardna greška; IV- interval varijacije

5.3.3.3. Poređenje koncentracije kortizola u opranim i neopranim uzorcima dlake

Poređenje koncentracije kortizola u neopranoj i opranoj dlaci kod goveda rasa holštajn i buša prikazano je na grafikonu 1.



Grafikon 1. Rezultati koncentracije kortizola u neopranoj i opranoj dlaci kod junica rasa holštajn i buša predstavljani kao prosečne vrednosti \pm SE

Koncentracija kortizola u neopranim uzorcima dlake bila je značajno veća nego u opranim i kod goveda holštajn i buša rase, ($p < 0,01$ redom) (grafikon 1). Procentualno predstavljeno, kod holštajn goveda je bilo 23%, a kod buša goveda 32% manje kortizola u opranoj dlaci nego u neopranoj.

5.4. KONCENTRACIJE KORTIZOLA I KORTIKOSTERONA U KRVI, MLEKU I DLACI OGLEDNIH KRAVA

5.4.1. Koncentracije kortizola u krvi

Koncentracija kortizola u krvi nije se značajno razlikovala između netretirane i tretirane grupe u P0, P1 i P2 periodima uzorkovanja. Takođe, nije postojala značajna razlika ni između prva tri perioda uzorkovanja unutar netretirane i tretirane grupe, iako je u netretiranoj grupi došlo do povećanja koncentracije kortizola u P1 i P2 periodima u odnosu na prvo inicijalno uzorkovanje. U P3 i P4 periodima, koncentracija kortizola u krvi je bila značajno veća kod netretirane u odnosu na tretiranu grupu, ($p < 0,01$, pojedinačno). Unutar netretirane grupe u P3 i P4 periodima nastavilo se povećanje koncentracije kortizola, tako da je bila značajno veća u P3 u odnosu na P0 i P1 ($p < 0,01$, pojedinačno), a u P4 značajno veća u odnosu na P0, P1 i P2 periode ($p < 0,01$, pojedinačno). Za razliku od netretirane grupe, u tretiranoj grupi je samo u P4 periodu bila značajno veća koncentracija kortizola u odnosu na P0 period ($p < 0,05$) (Tabela 13).

5.4.2. Koncentracija kortikosterona u krvi

Koncentracija kortikosterona u krvi nije se razlikovala između netretirane i tretirane grupe na početku ogleda, pre tretmana antiektroparazitikom. U svim narednim periodima, P1, P2, P3 i P4 koncentracija kortikosterona u krvi je bila značajno veća kod netretirane u odnosu na tretiranu grupu ($p < 0,01$ za periode P1 i P2 i $p < 0,05$ za periode P3 i P4). Između uzorkovanja unutar netretirane grupe, koncentracija kortikosterona se u početku povećavala, a zatim smanjila, tako da je u P2 periodu bila značajno veća u odnosu na P0 ($p < 0,01$), zatim u periodu P3 značajno manja u odnosu na P1 i P2 ($p < 0,05$ i $p < 0,01$, redom), kao i u periodu P4 značajno manja u odnosu na P2 ($p < 0,01$). Unutar tretirane grupe nije bilo značajne razlike između perioda uzorkovanja (Tabela 13).

Tabela 13. Koncentracija kortizola i kortikosterona krvi kod netretirane i tretirane grupe

		Kortizol krvi (ng/ml)		Kortikosteron krvi (ng/ml)	
		Netretirana grupa	Tretirana grupa	Netretirana grupa	Tretirana grupa
DT	PU (d)	X ± SE	X ± SE	X ± SE	X ± SE
0	P0 (0)	5,90 ± 0,44 ^{aA}	5,88 ± 0,19 ^{aA}	3,46 ± 0,26 ^{aAC}	3,04 ± 0,31 ^{aA}
-	P1(21)	6,68 ± 0,59 ^{aA}	5,85 ± 0,72 ^{aAB}	4,12 ± 0,45^{aAB}	2,34 ± 0,27^{bA}
28	-				
-	P2(42)	8,50 ± 1,15 ^{aAB}	5,75 ± 0,90 ^{aAB}	5,27 ± 0,66^{aB}	3,14 ± 0,37^{bA}
56	-				
-	P3(63)	10,56 ± 1,23^{aBC}	5,92 ± 0,82^{bAB}	2,95 ± 0,22^{aC}	2,35 ± 0,16^{bA}
-	P4(84)	14,19 ± 1,40^{aC}	7,28 ± 0,62^{bB}	3,25 ± 0,33^{aC}	2,43 ± 0,17^{bA}

DT - Dani tretmana; PU(d) - Periodi uzorkovanja (dani); X-srednja vrednost; SE-standardna greška

^{a,b} - Vrednosti kortizola, odnosno kortikosterona, pojedinačno, u redovima sa različitim malim slovima značajno se razlikuju ($p < 0,05$; $p < 0,01$; - naznačeno u tekstu)

^{A,B,C} - Vrednosti kortizola odnosno kortikosterona, pojedinačno, u kolonama sa različitim velikim slovima značajno se razlikuju ($p < 0,05$; $p < 0,01$; - naznačeno u tekstu)

5.4.3. Koncentracija kortizola u mleku

Nije postojala značajna razlika u koncentraciji kortizola u mleku ni u jednom periodu uzorkovanja između netretirane i tretirane grupe. Unutar netretirane grupe, utvrđeno je značajno povećanje koncentracije kortizola u P3 periodu u poređenju sa P0 i P1 ($p < 0,01$ i $p < 0,05$, redom), dok je u tretiranoj grupi utvrđeno značajno povećanje kortizola u P4 u odnosu na P1 period ($p < 0,05$) (Tabela 14).

5.4.4. Koncentracija kortikosterona u mleku

Vrednosti koncentracije kortikosterona u mleku u inicijalnom uzorkovanju pre tretmana nisu se razlikovale između netretirane i tretirane grupe. U svim narednim periodima, P1, P2, P3 i P4, koncentracija kortikosterona je bila značajno veća kod netretirane u odnosu na tretiranu grupu ($p < 0,05$ za P1 i $p < 0,01$ za P2, P3 i P4 periode). Unutar netretirane grupe, postojala je značajna razlika između svih perioda uzorkovanja ($p < 0,01$), a najveća koncentracija kortikosterona je utvrđena u P2 periodu. U tretiranoj grupi koncentracija kortikosterona je bila značajno manja u P0 periodu u odnosu na P3 i P4 ($p < 0,01$, pojedinačno), dok je u P1 periodu bila značajno manja u odnosu na P2, P3 i P4 ($p < 0,05$ za P2 i $p < 0,01$ za P3 i P4 periode) (Tabela 14).

Tabela 14. Koncentracija kortizola i kortikosterona u mleku kod netretirane i tretirane grupe

		Kortizol mleka (ng/ml)				Kortikosteron mleka (ng/ml)			
		Netretirana grupa		Tretirana grupa		Netretirana grupa		Tretirana grupa	
DT	PU (d)	M_e	LQ - UQ	M_e	LQ - UQ	M_e	LQ - UQ	M_e	LQ - UQ
0	P0 (0)	0,19 ^{aA}	0,18 - 0,23	0,23 ^{aAB}	0,19 - 0,30	0,22 ^{aA}	0,22 - 0,26	0,28 ^{aAC}	0,25 - 0,33
-	P1(21)	0,21 ^{aA}	0,19 - 0,26	0,19 ^{aA}	0,13 - 0,27	0,36^{aB}	0,27 - 0,78	0,23^{bA}	0,22 - 0,29
28	-								
-	P2(42)	0,26 ^{aAB}	0,20 - 0,31	0,24 ^{aAB}	0,21 - 0,31	3,29^{aC}	1,23 - 3,83	0,42^{bCB}	0,23 - 0,50
56	-								
-	P3(63)	0,26 ^{aB}	0,23 - 0,30	0,26 ^{aAB}	0,22 - 0,35	1,04^{aD}	0,88 - 1,35	0,49^{bB}	0,41 - 0,54
-	P4(84)	0,22 ^{aAB}	0,19 - 0,33	0,30 ^{aB}	0,24 - 0,38	1,24^{aE}	0,83 - 1,47	0,57^{bB}	0,46 - 0,64

DT - Dani tretmana; PU(d) - Periodi uzorkovanja (dani); M_e - mediana; LQ - donji kvartil; UQ - gornji kvartil

^{a,b} - Vrednosti u redovima, vrednosti mediane, sa različitim malim slovima zasnovane na Mann-Whitney U testu se značajno razlikuju ($p < 0,05$; $p < 0,01$; - naznačeno u tekstu)

^{A,B,C,D,E} - Vrednosti u kolonama, vrednosti mediane, sa različitim velikim slovima zasnovane na Wilcoxon testu se značajno razlikuju ($p < 0,05$; $p < 0,01$; - naznačeno u tekstu)

5.4.5. Koncentracija kortizola u dlaci

U uzorcima dlake odvojeno su određivane koncentracije kortizola u proksimalnom i distalnom segmentu bele dlake tokom svih perioda uzorkovanja kod netretirane i tretirane grupe.

5.4.5.1. Koncentracija kortizola u različitim segmentima dlake (proksimalnom i distalnom)

U tabeli 15, prikazani su rezultati koncentracije kortizola u proksimalnom i distalnom segmentu dlake kod netretirane i tretirane grupe krava u svim periodima uzorkovanja.

Tabela 15. Koncentracija kortizola u proksimalnom i distalnom segmentu bele dlake

		Kortizol u proksimalnom segmentu dlake (ng/g)		Kortizol u distalnom segmentu dlake (ng/g)	
		Netretirana grupa	Tretirana grupa	Netretirana grupa	Tretirana grupa
DT	PU (d)	X ± SE	X ± SE	X ± SE	X ± SE
0	P0 (0)	172,58 ± 24,45 ^{aA}	209,78 ± 25,60 ^{aAB}	173,00 ± 23,77 ^{aA}	221,30 ± 15,89 ^{aAB}
-	P1(21)	243,58 ± 28,16^{aAB}	165,10 ± 14,05^{bA}	193,63 ± 30,57 ^{aAB}	198,80 ± 15,93 ^{aAC}
28	-	309,73 ± 14,14^{aB}	260,78 ± 13,08^{bB}	269,90 ± 22,82 ^{aB}	273,22 ± 24,72 ^{aB}
56	-	199,75 ± 13,07 ^{aA}	177,44 ± 16,24 ^{aA}	175,00 ± 18,01 ^{aA}	152,38 ± 16,62 ^{aC}
-	P4(84)	207,09 ± 11,67 ^{aA}	183,11 ± 21,02 ^{aA}	197,91 ± 13,65 ^{aA}	170,57 ± 14,84 ^{aC}

DT - Dani tretmana; PU(d) - Periodi uzorkovanja (dani); X-srednja vrednost; SE-standardna greška

^{a,b} - Vrednosti kortizola u proksimalnom odnosno distalnom segmentu dlake, u redovima sa različitim malim slovima značajno se razlikuju ($p < 0,05$; $p < 0,01$; - naznačeno u tekstu)

^{A,B,C} - Vrednosti kortizola u proksimalnom odnosno distalnom segmentu dlake, u kolonama sa različitim velikim slovima značajno se razlikuju ($p < 0,05$; $p < 0,01$; - naznačeno u tekstu)

U inicijalnom periodu uzorkovanja, pre tretmana, nije bilo razlike u koncentraciji kortizola u proksimalnom segmentu dlake između netretirane i tretirane grupe. Nakon tretmana koncentracija kortizola u proksimalnom segmentu dlake je bila značajno manja kod tretirane u odnosu na netretiranu grupu u P1 i P2 periodima ($p < 0,05$, redom). U preostala dva perioda, nije bilo značajne razlike između grupa, ali je koncentracija kortizola kod tretirane grupe ostala manja u odnosu na netretiranu. Unutar netretirane grupe, koncentracija kortizola u dlaci se povećavala do P2 perioda u kome je bila značajno veća u odnosu na P0, P3 i P4 ($p < 0,01$, redom). Takođe, unutar tretirane grupe najveća koncentracija kortizola u dlaci je bila u P2 periodu i bila je značajno veća u odnosu na P1, P3 i P4 ($p < 0,01$, redom) (Tabela 15).

U distalnom segmentu dlake nije postojala značajna razlika u koncentraciji kortizola između netretirane i tretirane grupe (Tabela 15).

Unutar netretirane grupe, najveća koncentracija kortizola je bila u P2 periodu i bila je značajno veća u odnosu na periode P0 ($p<0,05$) i P3 i P4 ($p<0,01$ i $p<0,05$ redom). U tretiranoj grupi najveća koncentracija kortizola je bila u P2 periodu i bila je značajno veće u odnosu na P1 period ($p<0,05$) kao i P3 i P4 ($p<0,01$, redom). Takođe, koncentracija kortizola u P0 periodu je bila značajno veća u poređenju sa periodom P3 ($p<0,01$) i P4 ($p<0,05$) (Tabela 15).

Između proksimalnih i distalnih segmenata dlake nije postojala statistički značajna razlika u koncentraciji kortizola ni u jednom periodu uzorkovanja.

5.4.6. Koncentracija kortikosterona u dlaci

U uzorcima dlake odvojeno je određivana koncentracija kortikosterona u proksimalnom i distalnom segmentu bele dlake kod netretirane i tretirane grupe.

5.4.6.1. Koncentracija kortikosterona u različitim segmentima dlake (proksimalnom i distalnom)

U tabeli 16 prikazani su rezultati koncentracije kortikosterona u proksimalnom i distalnom segmentu dlake kod netretirane i tretirane grupe krava u svim periodima uzorkovanja.

Tabela 16. Koncentracija kortikosterona u proksimalnom i distalnom segmentu bele dlake

		Kortikosteron u proksimalnom segmentu dlake (ng/g)		Kortikosteron u distalnom segmentu dlake (ng/g)	
		Netretirana grupa	Tretirana grupa	Netretirana grupa	Tretirana grupa
DT	PU (d)	$X \pm SE$	$X \pm SE$	$X \pm SE$	$X \pm SE$
	0 P0 (0)	$17,28 \pm 1,33^{aA}$	$19,06 \pm 1,08^{aA}$	$17,01 \pm 0,72^{aA}$	$18,37 \pm 1,18^{aA}$
	- P1(21)	$21,94 \pm 2,04^{aB}$	$22,95 \pm 0,9^{aB}$	$17,46 \pm 0,96^{aA}$	$20,11 \pm 1,19^{aA}$
28	- P2(42)	$34,05 \pm 2,63^{aC}$	$11,95 \pm 0,97^{bC}$	$33,19 \pm 1,84^{aB}$	$11,52 \pm 1,31^{bB}$
56	- P3(63)	$26,27 \pm 1,91^{aC}$	$21,60 \pm 1,91^{aAB}$	$23,73 \pm 2,29^{aC}$	$19,49 \pm 2,30^{aA}$
	- P4(84)	$26,91 \pm 2,17^{aB}$	$24,84 \pm 1,31^{aB}$	$26,80 \pm 1,89^{aC}$	$23,99 \pm 2,37^{aA}$

DT - Dani tretmana; PU(d) - Periodi uzorkovanja (dani); X-srednja vrednost; SE-standardna greška

^{a,b} - Vrednosti kortikosterona u proksimalnom odnosno distalnom segmentu dlake, u redovima sa različitim malim slovima značajno se razlikuju ($p<0,05$; $p<0,01$; - naznačeno u tekstu)

^{A,B,C} - Vrednosti kortikosterona u proksimalnom odnosno distalnom segmentu dlake, u kolonama sa različitim velikim slovima značajno se razlikuju ($p<0,05$; $p<0,01$; - naznačeno u tekstu)

Koncentracija kortikosterona u proksimalnom segmentu dlake nije se značajno razlikovala u prva dva perioda, P0 i P1, između netretirane i tretirane grupe. U P2 periodu, koncentracija kortikosterona je bila značajno veća kod tretirane u odnosu na netretiranu grupu ($p < 0,01$). U sledećim uzorkovanjima, P3 i P4, nije bilo značajne razlike između netretirane i tretirane grupe. Unutar netretirane grupe, najveća koncentracija kortikosterona u proksimalnom segmentu dlake je bila u P2 periodu i bila je značajno veća u odnosu na periode P0 i P1 ($p < 0,01$, redom) kao i P4 ($p < 0,05$). U prvom uzorkovanju, P0, koncentracija kortikosterona je bila značajno manja nego u svim ostalim periodima, P1 ($p < 0,05$) i P2, P3 i P4 ($p < 0,01$, redom). Kod tretirane grupe, najmanja koncentracija kortikosterona u proksimalnom segmentu dlake bila je u P2 periodu i bila je značajno manja u odnosu na P0, P1, P3 i P4 periode ($p < 0,01$, redom). Značajno manja koncentracija kortikosterona utvrđena je i u P0 periodu u odnosu na P1 i P4 ($p < 0,05$ i $p < 0,01$, redom) (Tabela 16).

Koncentracija kortikosterona u distalnom segmentu dlake bila je značajno veća kod netretirane grupe u odnosu na tretiranu samo u P2 periodu ($p < 0,01$).

Unutar netretirane grupe koncentracija kortikosterona je bila značajno veća u P2 periodu u poređenju sa P0, P1 i P3 ($p < 0,01$, redom) kao i P4 ($p < 0,05$). U tretiranoj grupi koncentracija kortikosterona je bila značajno niža u P2 periodu u poređenju sa P0, P1, P3 i P4 ($p < 0,01$, redom) (Tabela 16).

Između proksimalnih i distalnih segmenata dlake nije postojala statistički značajna razlika u koncentraciji kortikosterona ni u jednom periodu uzorkovanja.

5.4.7. Koncentracija kortizola i kortikosterona u crnoj dlaci i poređenje sa belom dlakom

Koncentracije kortizola i kortikosterona u crnoj dlaci određivane su u nepodeljenim uzorcima dlake. Rezultati koncentracije kortizola i kortikosterona u uzorcima crne dlake kod netretirane i tretirane grupe tokom svih perioda uzorkovanja kao i njihovo poređenje sa belom dlakom prikazani su u tabeli 17.

Tabela 17. Koncentracija kortizola i kortikosterona u crnoj dlaci između netretirane i tretirane grupe i poređenje sa belom dlakom

Kortizol u crnoj dlaci (ng/g)				Kortikosteron u crnoj dlaci (ng/g)	
		Netretirana grupa	Tretirana grupa	Netretirana grupa	Tretirana grupa
DT	PU (d)	X ± SE	X ± SE	X ± SE	X ± SE
0 - 28 56	P0 (0)	190,25 ± 25,83^{aA}	282,67 ± 33,38^{bAC}	17,76 ± 2,77 ^{aA}	27,12 ± 3,67 ^{aA}
	P1(21)	306,05 ± 35,50 ^{aB}	298,67 ± 27,02 ^{aA*}	23,14 ± 3,42 ^{aA}	28,79 ± 3,57 ^{aAB}
	P2(42)	254,06 ± 35,02 ^{aBC}	325,11 ± 25,07 ^{aA*}	26,28 ± 2,12 ^{aA*}	20,83 ± 2,65 ^{aB*}
	P3(63)	223,00 ± 20,00 ^{aAC}	231,72 ± 15,75 ^{aBC**}	27,25 ± 1,82^{aA}	20,83 ± 1,01^{bAB}
-	P4(84)	244,67 ± 7,24 ^{aAB**}	204,56 ± 22,08 ^{aB*}	25,04 ± 3,61 ^{aA}	23,84 ± 1,57 ^{aAB}
Kortizol u beloju dlaci (ng/g)				Kortikosteron u beloju dlaci (ng/g)	
		Netretirana grupa	Tretirana grupa	Netretirana grupa	Tretirana grupa
0 - 28 56	P0 (0)	169,15 ± 26,74	209,94 ± 15,75	15,99 ± 1,08	18,64 ± 1,21
	P1(21)	244,00 ± 34,07	182,72 ± 15,49*	21,93 ± 2,39	23,65 ± 1,38
	P2(42)	288,94 ± 19,12	267,22 ± 9,36*	32,07 ± 1,31*	11,66 ± 0,85*
	P3(63)	186,70 ± 14,92	170,96 ± 13,21**	25,25 ± 1,53	19,13 ± 1,82
-	P4(84)	202,22 ± 7,56**	175,65 ± 16,95*	30,38 ± 2,10	22,97 ± 2,82

DT - Dani tretmana; PU(d) - Periodi uzorkovanja (dani); X-srednja vrednost; SE-standardna greška

^{a,b} - Vrednosti kortizola odnosno kortikosterona u crnoj dlaci, u redovima sa različitim malim slovima značajno se razlikuju ($p < 0,05$; $p < 0,01$; - naznačeno u tekstu)

^{A,B,C} - Vrednosti kortizola odnosno kortikosterona u crnoj dlaci, u kolonama sa različitim velikim slovima značajno se razlikuju ($p < 0,05$; $p < 0,01$; - naznačeno u tekstu)

* - Vrednosti kortizola odnosno kortikosterona između crne i bele dlake u istim grupama označene zvezdicom se značajno razlikuju ($p < 0,05$)

** - Vrednosti kortizola odnosno kortikosterona između crne i bele dlake u istim grupama označene sa dve zvezdice se značajno razlikuju ($p < 0,01$)

U početnom periodu, koncentracija kortizola u crnoj dlaci je bila značajno veća kod grupe koja će biti tretirana nego u netretiranoj grupi ($p < 0,05$). U ostalim periodima uzorkovanja nije bilo značajne razlike u koncentraciji kortizola u crnoj dlaci između grupa. Unutar netretirane grupe koncentracije kortizola u crnoj dlaci bila je značajno manja u periodu P0 u odnosu na periode P1 i P2 ($p < 0,05$, redom), dok je u periodu P3 bila značajno manja u odnosu na period P1 ($p < 0,01$). Unutar tretirane grupe koncentracije kortizola u crnoj dlaci bila je značajno manja u periodu P4 u odnosu na

periode P0, P1 i P2 ($p < 0,01$, redom), dok je u periodu P3 bila značajno manja u odnosu na periode P1 i P2 ($p < 0,05$, redom).

Koncentracija kortikosterona u crnoj dlaci bila je veća kod tretirane grupe u prvom i drugom uzorkovanju u odnosu na netretiranu, ali bez značajne razlike. U P2 periodu, kod tretirane grupe se smanjila koncentracija kortikosterona i bila je značajno manja u odnosu na netretiranu grupu ($p < 0,05$). U preostalim periodima, zadržala se veća koncentracija kortikosterona kod netretirane grupe u odnosu na tretiranu, ali bez značajne razlike. Unutar netretirane grupe nije bilo razlike u koncentraciji kortikosterona u crnoj dlaci između perioda uzorkovanja. Unutar tretirane grupe koncentracija kortikosterona je bila značajno manja u P2 periodu u odnosu na P0 ($p < 0,01$).

Između bele i crne dlake kod netretirane grupe nije bilo značajne razlike u prva četiri perioda uzorkovanja, ali je koncentracija kortizola bila nešto viša u crnoj dlaci u odnosu na belu, osim u P2 periodu kada je došlo do povećanja koncentracije u beloj dlaci, a u crnoj je bila nešto niža. U periodu P4, u crnoj dlaci je bila značajno veća koncentracija kortizola nego u beloj dlaci ($p < 0,01$).

Kod tretirane grupe u P0 periodu bila je veća koncentracija kortizola u crnoj dlaci u odnosu na belu, ali bez značajne razlike. U svim ostalim periodima uzorkovanja koji su usledili nakon tretmana, koncentracija kortizola je bila značajno manja u beloj dlaci u odnosu na crnu ($p < 0,05$ za periode P1, P2 i P4 i $p < 0,01$ za P3) (Tabela 17).

Između bele i crne dlake nije bilo značajne razlike u koncentraciji kortikosterona kod netretirane grupe u prva dva perioda uzorkovanja, ali je u crnoj dlaci bilo nešto veća koncentracija kortikosterona. U P2 periodu, došlo je do povećanja koncentracije kortikosterona u beloj dlaci i bila je značajno veća nego u crnoj ($p < 0,05$), koja je ostala na istom nivou kao u prethodnim periodima. U preostala dva perioda, P3 i P4, nije bilo značajne razlike između bele i crne dlake (Tabela 17).

Kod tretirane grupe, koncentracija kortikosterona je bila veća u crnoj dlaci u odnosu na belu u svim periodima uzorkovanja, s tim da je u periodu P2 došlo do smanjenja koncentracije kortikosterona u beloj dlaci tako da je ona bilo značajno manja u odnosu na crnu dlaku ($p < 0,05$) (Tabela 17).

5.5. KORELACIJE KORTIZOLA I KORTIKOSTERONA U KRVI, MLEKU I DLACI

5.5.1. Korelacije kortizola između krvi, mleka i dlake

Korelacije u koncentraciji kortizola između krvi, mleka i dlake kod netretirane i tretirane grupe, kao i njihove zbirne korelacije prikazane su u tabeli 18.

Tabela 18. Korelacije kortizola u krvi, mleku i dlaci

	Netretirana grupa	Tretirana grupa	Zbirno
Krv-Mleko	R²=0,347 p=0,006	R ² =-0,281 p=0,847	R²=0,187 p=0,050
Krv-Dlaka	R ² =0,042 p=0,750	R ² =0,022 p=0,879	R ² =0,084 p=0,378
Mleko-Dlaka	R ² =-0,142 p=0,279	R ² =-0,024 p=0,868	R ² =-0,099 p=0,303

Kod netretirane grupe, jedino između koncentracija kortizola u krvi i mleku je ustanovljena značajno pozitivna korelacija (R²=0,347; p=0,006). Između ostalih bioloških medijuma nije bilo korelacija. U tretiranoj grupi nije bilo korelacije između bioloških materijala u kojima je određivana koncentracija kortizola. U rezultatima zbirnih korelacija obe grupe, takođe je postojala značajno pozitivna korelacija samo u koncentraciji kortizola između krvi i mleka (R²=0,187; p=0,05).

5.5.2. Korelacije kortikosterona između krvi, mleka i dlake

Korelacije u koncentraciji kortikosterona između krvi, mleka i dlake kod netretirane i tretirane grupe, kao i njihove zbirne korelacije prikazane su u tabeli 19.

Tabela 19. Korelacije kortikosterona u krvi, mleku i dlaci

	Netretirana grupa	Tretirana grupa	Zbirno
Krv-Mleko	R ² =0,221 p=0,090	R ² =0,011 p=0,937	R²=0,326 p=0,001
Krv-Dlaka	R²=0,266 p=0,040	R ² =-0,246 p=0,084	R²=0,269 p=0,004
Mleko-Dlaka	R²=0,515 p<0,001	R ² =-0,229 p=0,109	R²=0,496 p<0,001

Kod netretirane grupe, utvrđena je značajno pozitivna korelacija u koncentraciji kortikosterona između krvi i dlake (R²=0,266; p=0,04) i mleka i dlake (R²=0,515;

$p < 0,001$), dok korelacija između krvi i mleka nije postojala. U tretiranoj grupi nije postojala korelacija između bioloških materijala u kojima je određivana koncentracija kortikosterona. Rezultati zbirnih korelacija pokazuju postojanje značajno pozitivne korelacije između sva tri biološka materijala u kojima je određivana koncentracija kortikosterona (Tabela 19).

5.5.3. Ukupne korelacije između kortizola i kortikosterona u krvi, mleku i dlaci

Ukupne korelacije između koncentracija kortizola i kortikosterona u svim biološkim medijumima prikazane su u tabeli 20.

Tabela 20. Ukupne korelacije između kortizola i kortikosterona u sva tri biološka medijuma

Korelacije kortizol - kortikosteron (ukupne)	
Krv	$R^2=0,120$ $p=0,211$
Mleko	$R^2=0,129$ $p=0,171$
Dlaka	$R^2=0,238$ $p=0,012$

Ukupnim poređenjem između koncentracija kortizola i kortikosterona u krvi i mleku nije utvrđeno postojanje korelacija, dok je u dlaci utvrđena značajno pozitivna korelacija između koncentracije kortizola i kortikosterona (Tabela 20).

5.6. KONCENTRACIJA BIOHEMIJSKIH PARAMETARA KRVI OGLEDNIH KRAVA

Rezultati svih biohemijskih parametara krvi prikazani su za sve periode uzorkovanja kod netretirane i tretirane grupe u tabeli 21.

Tabela 21. Koncentracija biohemijskih parametara krvi

Parametri	PU	Netretirana grupa			Tretirana grupa		
		X	SE	IV	X	SE	IV
Glukoza (mmol/l)	P0	2,83	0,11	2,20 - 3,40	2,97	0,10	2,60 - 3,50
	P1	3,11	0,10	2,60 - 3,70	3,26	0,09	2,90 - 3,80
	P2	2,75	0,10	2,20 - 3,40	2,73	0,09	2,40 - 3,10
	P3	3,08	0,10	2,50 - 3,70	3,13	0,13	2,20 - 3,60
	P4	3,52	0,10	2,80 - 4,20	3,39	0,13	2,70 - 4,10
Ukupni proteini (g/l)	P0	87,33	7,02	42,00 - 118,00	77,60	5,91	49,00 - 115,00
	P1	79,42	4,11	57,00 - 101,00	82,50	1,10	77,00 - 89,00
	P2	67,58^A	4,24	43,00 - 91,00	88,60^B	4,26	72,00 - 113,00
	P3	74,08	1,60	67,00 - 85,00	77,90	1,52	71,00 - 86,00
	P4	68,58	6,86	37,00 - 119,00	78,40	2,01	71,00 - 86,00
Albumini (g/l)	P0	32,67	1,35	24,00 - 38,00	34,50	1,34	27,00 - 39,00
	P1	32,67^a	0,98	26,00 - 39,00	29,00^b	1,12	23,00 - 35,00
	P2	29,25	2,05	16,00 - 41,00	31,00	1,00	26,00 - 36,00
	P3	25,58^a	0,47	23,00 - 28,00	27,00^b	0,42	25,00 - 29,00
	P4	27,83	2,23	12,00 - 37,00	27,30	0,67	25,00 - 32,00
Globulini (g/l)	P0	54,75	6,10	18,00 - 84,00	43,00	5,95	22,00 - 85,00
	P1	46,75	4,25	22,00 - 65,00	53,30	1,65	45,00 - 62,00
	P2	38,75^A	3,77	19,00 - 64,00	58,00^B	3,68	44,00 - 83,00
	P3	48,67	1,48	42,00 - 61,00	51,00	1,62	45,00-60,00
	P4	40,83	5,59	19,00 - 91,00	51,10	1,92	44,00-59,00
UREA (mmol/l)	P0	6,63	0,44	3,40 - 8,40	5,53	0,60	2,60 - 9,40
	P1	5,46	0,30	4,10 - 7,60	5,21	0,38	3,30 - 7,40
	P2	1,88	0,13	1,10 - 2,40	3,02	1,02	1,00 - 12,00
	P3	0,76	0,06	0,50 - 1,30	0,92	0,05	0,80 - 1,30
	P4	0,98	0,10	0,60 - 1,80	0,79	0,04	0,60 - 1,00
Ukupni bilirubin (μmol/l)	P0	11,30	2,19	1,60 - 26,00	6,17	2,67	1,80 - 28,00
	P1	3,05	0,47	1,20 - 6,00	3,10	0,35	2,00 - 5,00
	P2	2,04^a	0,28	1,40 - 5,00	3,57^b	0,57	1,80 - 6,00
	P3	1,98	0,10	1,50 - 2,70	2,01	0,10	1,50 - 2,50
	P4	2,79	0,76	1,40 - 11,00	1,98	0,08	1,60 - 2,50
Kreatin kinaza (u/l)	P0	118,75	12,40	55,00 - 197,00	145,90	16,64	72,00 - 222,00
	P1	165,17	30,49	86,00 - 469,00	194,90	53,83	75,00 - 658,00
	P2	112,17	9,73	48,00 - 160,00	134,50	20,07	55,00 - 262,00
	P3	99,67	18,09	33,00 - 266,00	114,90	11,24	69,00 - 284,00
	P4	109,83	8,84	70,00 - 154,00	137,50	17,83	50,00 - 249,00
Alkalna fosfataza (u/l)	P0	102,83	8,31	37,00 - 140,00	97,60	10,19	57,00 - 153,00
	P1	61,83	4,34	38,00 - 85,00	57,90	3,48	46,00 - 77,00
	P2	53,58	6,36	24,00 - 92,00	53,70	7,02	4,00 - 79,00
	P3	57,83^a	5,11	38,00 - 88,00	73,60^b	5,16	56,00 - 109,00
	P4	93,08	11,36	32,00 - 176,00	86,60	4,79	64,00 - 116,00

PU - Periodi uzorkovanja; X-srednja vrednost; SE-standardna greška; IV- interval varijacije

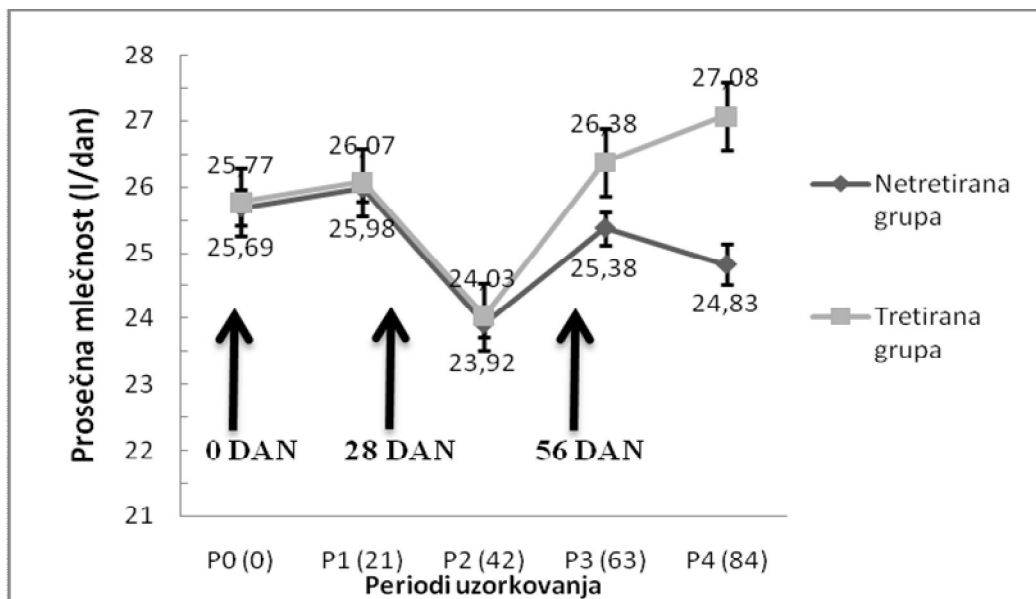
^{a-b} - Vrednosti u istom redu sa različitim malim slovom imaju značajnu razliku ($p < 0,05$)

^{A-B} - Vrednosti u istom redu sa različitim velikim slovom imaju značajnu razliku ($p < 0,01$)

Vrednosti koncentracije glukoze u krvi kod netretirane i tretirane grupe nisu se razlikovale ni u jednom periodu uzorkovanja. Vrednosti su bile u fiziološkom rasponu. Koncentracija ukupnih proteina bila je značajno veća samo u P2 periodu kod tretirane u odnosu na netretiranu grupu ($p < 0,01$). U ostalim periodima nije bilo značajne razlike u koncentraciji ukupnih proteina. Prosečne vrednosti albumina bile su u P1 periodu značajno manje, a u P3 periodu značajno veće kod tretirane u poređenju sa netretiranom grupom ($p < 0,05$ redom). U P2 periodu su vrednosti globulina bile značajno veće u tretiranoj grupi ($p < 0,01$). Koncentracija uree nije se značajno razlikovala između grupa, dok je koncentracija ukupnog bilirubina bila značajno veća u P2 periodu kod tretirane grupe ($p < 0,05$), ali su vrednosti bile u fiziološkom rasponu. Aktivnost enzima CK nije pokazivala značajne razlike između grupa, dok je aktivnost ALP u P3 periodu bila značajno veća kod tretirane grupe ($p < 0,05$). Vrednosti enzima su takođe bile u fiziološkom rasponu.

5.7. MLEČNOST OGLEDNIH KRAVA

Između tretirane i netretirane grupe nije bilo značajne razlike u prosečnoj mlečnosti.



Grafikon 2. Kretanje mlečnosti tokom perioda uzorkovanja kod netretirane i tretirane grupe prikazani kao prosečna mlečnost \pm SE

5.8. HEMIJSKI SASTAVA MLEKA I BROJ SOMATSKIH ĆELIJA U MLEKU OGLEDNIH KRAVA

Vrednosti parametara hemijskog sastava mleka nisu se značajno razlikovale između netretirane i tretirane grupe ni u jednom periodu uzorkovanja. Takođe, nije bilo ni razlike u broju somatskih ćelija između netretirane i tretirane grupe (Tabela 22).

Tabela 22. Hemijski sastav mleka i broj somatskih ćelija

Parametri	PU	Netretirana grupa			Tretirana grupa		
		X	SE	IV	X	SE	IV
Mlečna mast (%)	P0	3,70	0,16	2,78-4,46	3,65	0,25	2,28-5,28
	P1	3,75	0,18	2,81-5,31	3,54	0,27	1,79-4,71
	P2	4,36	0,16	3,82-5,42	4,68	0,48	2,57-6,76
	P3	4,29	0,23	3,21-5,85	4,21	0,37	2,94-6,46
	P4	4,22	0,19	3,46-5,62	3,83	0,25	2,96-5,48
Proteini (%)	P0	3,10	0,10	2,61-3,75	3,18	0,13	2,50-4,00
	P1	3,11	0,08	2,65-3,62	3,30	0,15	2,68-4,17
	P2	3,28	0,10	2,72-3,79	3,45	0,18	2,82-4,67
	P3	3,41	0,08	2,94-3,75	3,64	0,14	2,93-4,46
	P4	3,75	0,11	2,78-4,32	3,83	0,16	3,18-5,03
Laktoza (%)	P0	4,53	0,06	4,23-4,76	4,41	0,08	3,95-4,73
	P1	4,52	0,04	4,29-4,72	4,42	0,11	3,60-4,67
	P2	4,31	0,05	4,10-4,56	4,14	0,10	3,46-4,47
	P3	4,29	0,10	3,33-4,58	4,12	0,15	3,00-4,53
	P4	4,19	0,10	3,51-4,53	4,23	0,09	3,55-4,59
Suva materija (%)	P0	12,20	0,19	11,29-12,23	12,12	0,32	10,85-14,08
	P1	12,26	0,17	11,05-13,31	12,13	0,35	10,62-13,83
	P2	12,85	0,19	12,16-14,14	13,17	0,51	10,88-15,80
	P3	12,94	0,26	11,61-14,68	12,99	0,42	11,29-15,87
	P4	12,98	0,32	11,19-14,87	12,88	0,35	11,42-14,99
Suva materija bez masti (%)	P0	8,50	0,08	8,10-8,96	8,48	0,12	7,92-9,16
	P1	8,51	0,09	8,00-8,86	8,62	0,15	7,71-9,59
	P2	8,49	0,09	7,75-8,86	8,49	0,16	7,67-9,60
	P3	8,65	0,11	7,78-9,12	8,79	0,14	8,11-9,52
	P4	8,93	0,16	7,25-9,25	9,01	0,12	8,45-9,63
		G	SE	IV	G	SE	IV
Broj somatskih ćelija x 1000/ml	P0	199,92	141,13	27-1411	239,86	572,51	32-5943
	P1	189,52	194,57	26-2104	179,82	423,93	38-3809
	P2	203,23	112,76	59-1196	347,36	570,91	66-5985
	P3	333,69	578,38	6-5379	514,27	570,76	63-4450
	P4	769,22	365,25	104-4158	466,77	766,45	56-6545

PU(d)-Periodi uzorkovanja; *X*-srednja vrednost; *SE*-standardna greška; *IV*-interval varijacije; *G*-geometrijska sredina (predstavljene samo vrednosti za broj somatskih ćelija u mleku)

DISKUSIJA

Određivanje koncentracije kortizola u krvi koristi se kao standardna metoda za procenu izloženosti stresu kod životinja (Trevisi i Bertoni, 2009). Međutim, procena dobijenih rezultata nije uvek jednostavna jer koncentracija kortizola u krvi pokazuje značajne varijacije. Iz tog razloga bitno je utvrditi bazalne koncentracije kortizola, kako u krvi, tako i u ostalim biološkim materijalima (mleko i dlaka). Pravilna procena bazalnih vrednosti kod životinja je značajna da bi se utvrdilo da li porast koncentracije kortizola koji ponekad nije veliki, jeste posledica stresa ili je rezultat varijabilnosti vrednosti kortizola u bazalnim uslovima (Trevisi i sar. 2005).

U prvom delu ogleda ispitivane su bazalne vrednosti koncentracije kortizola u krvi, mleku i dlaci kod visoko-proizvodne holštajn rase goveda i upoređene su sa nisko-proizvodnom buša rasom goveda. Dobijene bazalne vrednosti koncentracije kortizola u krvi kod holštajn krava bile su u skladu sa vrednostima objavljenim od strane drugih autora (Hudson i sar. 1975; Šamanc i sar. 1999). Međutim, kod holštajn junica koncentracija kortizola u krvi se razlikovala od rezultata objavljenih od strane Bustamante i saradnika (2015), koji su utvrdili veću koncentraciju kortizola u krvi junica. Ovakvi rezultati bi mogli biti posledica individualnih razlika u koncentraciji kortizola između životinja ili posledica starosti životinja, jer su junice u ovom radu bile većinom starosti oko 20 meseci što je približno odraslim jedinkama. Koncentracija kortizola u krvi kod holštajn rase goveda bila je značajno veća u odnosu na buša rasu goveda. S obzirom da lučenje kortizola kod goveda varira tokom dana i regulisano je cirkadijalnim ritmom lučenja ACTH, niže koncentracije kortizola u krvi buša rase u odnosu na holštajn rasu, mogu da budu posledica razlike u aktivnosti HPA osovine između ove dve rase goveda genetski različite po proizvodnoj aktivnosti. U prilog tome idu i podaci objavljeni od strane Sgorlon i saradnika (2015), koji su utvrdili da na razlike u aktivnosti HPA osovine utiču, pored faktora iz spoljašnje sredine, i genetski faktori.

Koncentracija bazalnih vrednosti kortizola u mleku krava holštajn rase bila je značajno veća nego u mleku buša krava. Ovi rezultati su u skladu sa podacima objavljenim od strane Sgorlon i saradnika (2015) koji su utvrdili veće koncentracije kortizola u mleku holštajn krava u odnosu na krave simentalne rase. Kako

koncentracija kortizola u mleku odražava slobodnu frakciju kortizola iz krvi (Shutt i Fell, 1985), rezultati su očekivani i u skladu su sa većom koncentracijom kortizola u krvi kod holštajn krava. Kao što je opisano u poglavlju materijal i metode, koncentracija kortizola u radu je određena u mlečnom serumu, a ne u obranom mleku koje većina autora (Shutt i Fell, 1985; Gygax i sar. 2006; Fukasawa i sar. 2008) koristi za ekstrakciju glukokortikosteroida. To je verovatno razlog što u našem radu, koncentracija kortizola u mleku je nešto niža ali i dalje uporediva sa literaturnim podacima (Tucker i Schwalm, 1977), jer se kortizol u obranom mleku u istom procentu nalazi vezan za proteine surutke i kazein (Schwalm i Tucker, 1978).

Za određivanje koncentracije glukokortikosteroida u dlaci bilo je neophodno izvršiti validaciju ELISA metode. Dobijene vrednosti intraassay CV za koncentraciju kortizola u uzorcima sa visokom i niskom koncentracijom kortizola bile su u skladu sa vrednostima koje predlaže odluka komisije (European Commission, 2002). Vrednosti interassay CV za koncentraciju kortizola u uzorcima sa visokom i niskom koncentracijom kortizola su prema istoj odluci takođe prihvatljive. Takođe, vrednost recovery testa za kortizol koja se kretala od 101% do 124% je prihvatljiva. Vrednosti intraassay i interassay CV za kortikosteron bile su u skladu sa odlukom komisije. Recovery vrednosti testa za kortikosteron kretale su se od 90% do 112%. Iz rezultata dobijenih validacijom ELISA metoda za određivanje koncentracije kortizola i kortikosterona u dlaci, može se zaključiti da upotrebljeni testovi pokazuju dobru senzitivnost, specifičnost, ponovljivost i *recovery*, tako da se mogu koristiti kao metode za određivanje glukokortikosteroida u dlaci.

Određivanje koncentracije kortizola u dlaci pruža mogućnost praćenja aktivnosti HPA osovine kod krava tokom dužeg vremenskog perioda (Comin i sar. 2013). S obzirom da su mehanizmi prelaska kortizola u dlaku različiti i nisu potpuno jasni, za utvrđivanje bazalnih vrednosti utvrdili smo koncentraciju kortizola u različitim segmentima dlake. Pošto kortizol prelazi iz cirkulacije u dlaku i može da difunduje kroz nju (Gow i sar. 2010) određena je njegova koncentracija u različitim segmentima dlake. Takođe, kako bi se utvrdila zastupljenost kortizola poreklom iz znojnih i lojnih žlezda na površini dlake, određena je njegova koncentracija u opranim i neopranim uzorcima dlake, uzimajući u obzir da je jedan od mehanizama prelaska kortizola u dlaku i preko znojnih i lojnih žlezda (Pragst i Balikova, 2006). Pored toga, uzeta je u obzir i boja

dlake kao i starost životinja, odnosno uticaj laktacije na koncentraciju kortizola jer postoje različiti podaci za koncentraciju kortizola u dlaci različite boje (Tallo-Parra i sar. 2005; González-de-la-Vara i sar. 2011), kao i u zavisnosti od starosti (González-de-la-Vara i sar. 2011).

Koncentracije kortizola u dlaci kod krava predstavljene u ovom radu su bile veće nego u radovima Tallo-Parra i saradnika (2005), Comin i saradnika (2011), Peric i saradnika (2013) i Burnet i saradnika (2014), ali su bile u opsegu vrednosti objavljenih za makaki majmune (Davenport i sar. 2006) i 15 dana staru žensku telad (González-de-la-Vara i sar. 2011). Jedan od razloga za veću koncentraciju kortizola moglo bi da bude to što je kortizol određivan u dlaci koja je uzeta sa područja repa gde je njegova koncentracija veća u odnosu na druge delove tela (Burnet i sar. 2014). Međutim, značajan uticaj na koncentraciju kortizola u dlaci ima i način pripreme uzoraka dlake. Uzorci u kojima je određivana koncentracija kortizola nisu bili oprani izopropanolom kao što su to radili navedeni i neki drugi autori (Tallo-Parra i sar. 2005; Davenport i sar. 2006; Comin i sar. 2011; Burnet i sar. 2014), jer je cilj bio da se odredi ukupna koncentracija kortizola koja se može naći u i na dlaci. Takođe, jedan od razloga veće koncentracije kortizola u dlaci može biti i unakrsna reaktivnost upotrebljenog testa sa drugim glukokortikosteroidima.

Kada je u pitanju zastupljenost koncentracije kortizola u različitim segmentima dlake, podaci u literaturi nisu ujednačeni. Kod ljudi, koncentracija kortizola se smanjuje od proksimalnog ka distalnom delu dlake (Kirshbaum i sar. 2009), dok kod makaki majmuna (Davenport i sar. 2006) i pasa (Bennett i Hayssen, 2010) nisu utvrđene razlike u koncentraciji kortizola između proksimalnog i distalnog segmenta dlake. U našim rezultatima prikazanim u ovom radu nisu utvrđene razlike u koncentraciji kortizola između proksimalnog i distalnog segmenta dlake kod holštajn rase goveda. Međutim, kod krava i junica rase buša utvrđena je značajno manja koncentracija kortizola u distalnom u odnosu na proksimalni segment dlake. Činjenica da goveda rase buša borave pretežno na paši, izloženi različitim vremenskim uticajima, ide u prilog mogućem tumačenju da u distalnim segmentima dlake, koji su više izloženi spoljašnjim uticajima, dolazi do povećane razgradnje kortizola. Ovo može potkrepiti i činjenica da povećano izlaganje sunčevoj svetlosti doprinosi povećanom razlaganju kortizola u dlaci (Roth i sar. 2016; Wester i sar. 2016). Suprotno bušama, holštajn goveda držana su u

zatvorenom prostoru i zaštićena od ekstremnih spoljašnjih uslova koji bi mogli uticati na smanjenje koncentracije kortizola u distalnom segmentu dlake.

Poređenjem koncentracija kortizola u dlaci između dve rase, utvrđeno je da holštajn goveda imaju značajno veću koncentraciju kortizola u odnosu na buša goveda u oba segmenta (proksimalnom i distalnom). Slični rezultati prikazani su u radu Peric i saradnika (2013) gde je koncentracija kortizola u dlaci kod goveda holštajn rase bila značajno veća u odnosu na ukršteno švedsko crveno goveće sa monbiliar rasom. Manja koncentracija kortizola kod goveda rase buša može se objasniti manjom aktivnošću HPA osovine kod ove rase, što je u skladu sa objašnjenjem Bennett i Hayssen (2010) da aktivnost HPA osovine utiče ne samo na koncentraciju kortizola u krvi, već i na koncentraciju ovog hormona u dlaci. Naime, pored u dlaci, holštajn rasa goveda u odnosu na druge rase, ima veću koncentraciju kortizola i u svim drugim biološkim medijumima, uključujući krv, mleko i pljuvačku (Hygashiyama i sar. 2014; Sgorlon i sar. 2015).

Koncentracija kortizola u dlaci različite boje utvrđena je samo kod holštajn rase goveda, jer buša goveda imaju „divlji“ tip dlake, koja predstavlja mešavinu različitih boja. Između crne i bele dlake kod holštajn rase nije postojala značajna razlika u koncentraciji kortizola. Prethodne studije koje su analizirale koncentraciju kortizola u dlaci različite boje su donekle kontradiktorne. González-de-la-Vara i saradnici (2011) i Burnet i saradnici (2014) utvrdili su značajno veću koncentraciju kortizola u beloj nego u crnoj dlaci, dok su Tallo-Parra i saradnici (2005) utvrdili značajno veću koncentraciju u crnoj dlaci. Sa druge strane, u istraživanjima sprovedenim na dlaci različite boje kod ljudi, nije ustanovljena razlika u koncentraciji kortizola između dlake različite boje (Kirshbaum i sar. 2009). Neki autori sugerišu da koncentracija steroidnih supstanci u dlaci zavisi od interakcije različitih supstanci kao i od prisustva oba melanina (Stout i sar. 2001). Tako je testosteron kod bikova prisutan u većoj koncentraciji u crnoj nego u beloj dlaci. Takođe, u istoj studiji pokazano je da su hormoni poput estradiola i testosterona kod krava prisutni u sličnim proporcijama u crnoj i beloj dlaci (Gleixner i sar. 1997). Na osnovu ovoga, moglo bi se pretpostaviti da kortizol ima isti afinitet za prelazak u crnu i belu dlaku kao što je opisano za estradiol i testosteron. Sva ova jedinjenja su mali lipofilni molekuli koji ulaze u ćelije pasivnom difuzijom i tako se

akumuliraju podjednako u beloj i crnoj dlaci. Slično tome, kod pasa nije utvrđena razlika u koncentraciji kortizola u dlaci različite boje (Bennett i Hayssen, 2010).

Da bi se procenio odnos između količine kortizola koji je ugrađen direktno u dlaku i onoga koji se nalazi na spoljašnjoj površini, a potiče iz znojnih i lojnih žlezda, odredili smo koncentraciju kortizola u neopranim i opranim uzorcima dlake kod holštajn i buša junica. Koncentracije kortizola u opranim uzorcima dlake bile su značajno niže u odnosu na neoprane uzorke dlake. Dobijeni rezultati pokazali su da je u opranim uzorcima dlake kod holštajn junica bilo 21% manje kortizola u odnosu na neoprane uzorke dok je kod buša junica bilo 32% manje kortizola u odnosu na neoprane uzorke dlake. Na osnovu ovih rezultata može se pretpostaviti da je površina dlake bila prekrivena znojem i lojem koji sadrže kortizol (Russell i sar. 2012), a koji se pranjem dlake uklanja sa površine. Ovakvi rezultati potvrđuju i prethodno iznesenu tvrdnju da način pripreme uzoraka dlake u ovom radu doprinosi većoj koncentraciji kortizola u uzorcima dlake u odnosu na literaturne podatke.

Poređenja koncentracija kortizola u krvi i dlaci između krava i junica iskorištena su za prikazivanje uticaja laktacije na koncentraciju kortizola. Odsustvo značajnih razlika u koncentraciji kortizola u krvi i dlaci kod holštajn krava i junica, koje je prikazano u ovom radu, pokazuje da laktacija nema značajnog uticaja na koncentraciju kortizola. Sa druge strane nivo kortizola u krvi nije se razlikovao kod krava i junica buša rase, dok je u dlaci kod buša krava bio značajno veći nego kod junica. Veća koncentracija kortizola u dlaci kod buša krava može biti posledica dužeg perioda akumulacije kortizola u dlaci. Kako navodi Dowling (1958), neadekvatni uslovi životne sredine i ishrane mogu sprečiti normalnu zamenu dlake kod životinja. Pošto se buša goveda gaje ekstenzivno na pašnjacima ona su obično neadekvatno snabdevena energijom (Prodanović i sar. 2013), tako da ovo ide u prilog produženom periodu akumulacije kortizola kod buša krava.

Posmatrajući sa fiziološke strane, mnogi faktori iz spoljašnje sredine kao i genetski faktori mogu uticati na koncentraciju kortizola (Golden i sar. 2011). Na osnovu toga može se pretpostaviti da genetska selekcija na visoku proizvodnju mleka kod holštajn goveda ima uticaja na povećanje aktivnosti HPA osovine, a samim tim i koncentracije kortizola. Pored toga, značajno je i da kortizol zajedno sa drugim hormonima utiče na razvoj mlečne žlezde (Briskin i O'Molloy, 2010) što je u

saglasnosti sa genetskom selekcijom i prilagođavanju holštajn rase na visoku proizvodnju. Na osnovu ovoga može se reći da su bazalne vrednosti kortizola kod visoko-produktivnih holštajn goveda veće nego kod nisko-produktivnih rasa.

U drugom delu istraživanja praćen je uticaj primene antiektoparazitika tokom toplog perioda godine na sprečavanje nastanka stresa kod visoko-mlečnih holštajn krava, kroz određivanje koncentracije glukokortikosteroida u krvi, mleku i dlaci. Bazalne vrednosti koncentracije kortizola u mleku i dlaci kod holštajn krava na početku oglada bile su uporedive sa prethodno ustanovljenim bazalnim vrednostima koncentracije kortizola kod holštajn krava sa iste farme. Međutim, jedino je prethodno utvrđena bazalna koncentracija kortizola u krvi kod holštajn krava bila nešto veća nego na početku oglada, što može biti posledica velikih individualnih varijacija u koncentracijama kortizola u krvi između životinja (Nikolić i sar. 1998).

Određivanje koncentracije kortizola u krvi značajno je zbog procene izloženosti akutnom stresu kod životinja, pošto se njegova koncentracija u krvi menja u zavisnosti od aktivnosti HPA osovine (Palme, 2012). Međutim, procena dobijenih rezultata nije uvek jednostavna jer koncentracija kortizola u krvi pokazuje značajnu varijabilnost na koju utiče i dnevni ritam lučenja (Saco i sar. 2008). Za razliku od kortizola, kortikosteron slabije reaguje povećanjem koncentracije kao posledica stimulacije HPA osovine i vrednosti se brže vraćaju ka početnim ili čak nižim (Morrow i sar. 2002). Takođe, varijacije u koncentraciji kortikosterona u krvi između različitih rasa goveda nisu značajnije izražene, za razliku od koncentracija kortizola (Venkataseshu i Estergreen, 1970). Pošto je koncentracija glukokortikosteroida u ovom radu bila veća kod netretiranih u odnosu na tretirane životinje može se pretpostaviti da ektoparaziti dovode do aktivacije HPA osovine i pokreću stresnu reakciju tako da predstavljaju značajne stresore kod visoko-mlečnih krava. Koncentracija kortizola i kortikosterona u krvi i kod tretirane i kod netretirane grupe bile su u skladu sa vrednostima predstavljenim u drugim studijama (Gwazdauskas i sar. 1972; Morrow i sar. 2002; Bertoni i sar. 2005; Mudroň i sar. 2005). Kako u prvom uzorkovanju (P0) nije postojala razlika u koncentraciji glukokortikosteroida (kortizola i kortikosterona) u krvi između netretirane i tretirane grupe krava, to nam pokazuje da je aktivnost HPA osovine bila na istom nivou kod obe grupe životinja jer su bile izložene istim uslovima spoljašnje

sredine, odnosno istom uticaju stresora. Međutim, kao što je prikazano u tabeli 14, nakon tretmana antiektoparazitikom, od perioda P1 do P4 koncentracije kortizola i kortikosterona razlikovale su se između netretirane i tretirane grupe, tako da se koncentracija glukokortikosteroida u tretiranoj grupi zadržala na početnim vrednostima, dok je kod netretirane grupe došlo do povećanja koncentracije kortizola. Ovakve vrednosti koncentracije kortizola idu u prilog tome da je tretirana grupa bila manje izložena dejstvu ektoparazita, a samim tim nije bilo ni stresnih stimulusa koji bi stimulisali sintezu kortizola i kortikosterona. Posmatrajući odgovor kortizola i kortikosterona na stresni stimulus može se zapaziti da je odgovor kortizola intenzivniji u odnosu na odgovor kortikosterona, što je u skladu sa istraživanjima Morrow i saradnika (2002). Pored toga, zanimljivo je i da je u periodima P3 i P4 kada je došlo do najvećeg povećanja koncentracije kortizola, došlo do smanjenja odgovora kortikosterona, što Venkateseshu i Estergreen (1970), objašnjavaju kao posledicu trošenja prekursora za kortikosteron za potrebe sinteze kortizola kao primarnog glukokortikosteroida kod goveda.

Vrednosti koncentracije kortizola u mleku mogu da se koriste kao indikatori aktivnosti HPA osovine kod mlečnih krava (Verkerk i sar. 1996). Uzorkovanje mleka je nestresogena procedura za životinje te je kao takva prihvatljiva sa aspekta dobrobiti životinja (Sgorlon i sar. 2005). Prema Verkerku i saradnicima (1998) koncentracija kortizola u mleku predstavlja odraz njegove koncentracije u krvi, jer slobodna frakcija kortizola iz krvi prelazi u mleko. Međutim, u ogledu koji je sproveden nije bilo značajne razlike u koncentraciji kortizola u mleku između kontrolne i eksperimentalne grupe. Prema Fox i saradnicima (1981) nakon aktivacije HPA osovine lučenje i prelazak kortizola iz krvi u mleko nastaje brzo, unutar 4 časa, ali ako se aktivnost HPA osovine ne održi na tako visokom nivou brzina prenosa kortizola iz krvi u mleko se smanjuje. Pošto su se krave u ogledu muzle na svakih 12 časova, moguće je da je koncentracija kortizola u mleku odraz dnevnih promena koncentracije. Međutim, koncentracija kortikosterona u mleku je bila veća kod netretirane grupe u odnosu na tretiranu u istim periodima uzorkovanja kao i koncentracija kortikosterona u krvi. Niža koncentracija kortikosterona kod tretirane grupe potvrđuje zaštitni efekat antiektoparazitika u nastanku stresa kod visoko-mlečnih krava. Ovakvi rezultati mogli bi ukazivati da je koncentracija kortikosterona u mleku bolji indikator aktivnosti HPA osovine nego

koncentracija kortizola. Takođe, koncentracija kortikosterona u mleku je bila veća nego koncentracija kortizola. Prema podacima koje su objavili Schwalm i Tucker (1978), veća koncentracija kortikosterona u mleku može biti posledica povećanog preuzimanja kortizola, katabolizma i konverzije kortizola u kortikosteron unutar mlečne žlezde. U netretiranoj grupi koncentracija kortikosterona je bila značajno veća nego u tretiranoj u uzorkovanjima nakon tretmana antiektoparazitikom. Ovakav rezultat ukazuje na stresni odgovor kod životinja koje nisu bile zaštićene od ektoparazita. Niža vrednost kortikosterona potvrđuje zaštitni efekat antiektoparazitika. Stoga, za razliku od koncentracije kortizola u mleku, koncentracija kortikosterona predstavlja snažan indikator aktivnosti HPA osovine.

Upotreba dlake kao biološkog medijuma za određivanje koncentracije glukokortikosteroida značajna je zbog mogućnosti praćenja aktivnosti HPA osovine tokom dužeg vremenskog perioda i dobijanja uzoraka na način koji je nestresogen za životinju (Bennett i Hayssen, 2010). Kako su ektoparaziti aktivni tokom celog letnjeg perioda njihov uticaj na životinje je dugotrajan tako da može da dovede do nastanka hroničnog stresa. Za praćenje i procenu hroničnog stresa kod oglednih krava glukokortikosteroidi su određivani u različitim segmentima dlake kao i u dlaci različite boje. U prvom uzorkovanju, pre tretmana (P0) nije bilo razlike u koncentraciji kortizola u beloj dlaci između netretirane i tretirane grupe. Stoga se može zaključiti da je intenzitet prelaska ovih hormona u dlaku pre tretmana bio isti u obe grupe, verovatno zbog izloženosti istim uslovima spoljašnje sredine. Međutim, u periodima P1 i P2 koncentracija kortizola u proksimalnom segmentu dlake u tretiranoj grupi bila je značajno manja nego u netretiranoj. Ovi periodi uzorkovanja se nalaze unutar prva dva tretmana antiektoparazitikom tako da ovi rezultati pokazuju da se tretmanom životinje štite od stresnog uticaja ektoparazita, a samim tim sprečava se i nastanak hroničnog stresa. Treći tretman antiektoparazitikom je bio 7 dana pre četvrtog uzorkovanja, i u tom periodu iako je koncentracija kortizola bila manja kod tretirane grupe u odnosu na netretiranu nije bilo značajnosti. Ovakav rezultat ukazuje da je zaštitni efekat prethodnog (drugog) tretmana verovatno oslabio, jer je od njega prošlo 35 dana, a prema uputstvu proizvođača tretman se može ponoviti posle 28 dana, dok je novi tretman imao kratak uticaj na zaštitu životinja tako da se kortizol počeo ponovo nakupljati u većoj količini u dlaci. Za razliku od proksimalnog segmenta dlake,

poređenjem koncentracija kortizola u distalnim segmentima bele dlake nije bilo razlike između netretirane i tretirane grupe. Poznato je da izlaganjem dlake UV zračenju dolazi do uništavanja kortizola u njoj (Roth i sar. 2016; Wester i sar. 2016). Iz tog razloga moguće je da je u drugoj polovini dlake koja je više izložena dejstvu svetlosti došlo do uništavanja kortizola. Takođe, distalni deo dlake je udaljeniji od površine kože te je manje izložen prelasku kortizola iz znojnih i lojnih žlezda. Kao što navode Gow i saradnici (2010), jedan od načina na koji se kortizol inkorporiše u dlaku jeste prelaskom iz krvnih kapilara u dlaku i daljom difuzijom kroz nju. Međutim, rastom dlake voda isparava iz nje i zamenjuje se prostorom ispunjenim vazduhom (Harkey, 1993), tako da u delu dlake udaljenijem od površine kože nije moguća dalja difuzija steroidnih supstanci. Na osnovu ovoga, odsustvo značajne razlike u koncentraciji kortizola između netretirane i tretirane grupe u drugoj polovini dlake može biti posledica destrukcije kortizola pod dejstvom spoljašnjih faktora, kao i nemogućnosti difuzije kortizola u taj deo dlake.

Određivanje koncentracije kortikosterona u dlaci kao indikatora dugotrajne aktivnosti HPA osovine ustanovljeno je kod pacova (Scorrano i sar. 2015; Uarquin i sar. 2016) i smatra se da je njegova ugradnja u dlaku istovetna kao i kod kortizola. Prema našem saznanju, nema literaturnih podataka o koncentraciji kortikosterona u dlaci goveda. Koncentracija kortikosterona je bila značajno veća samo u P2 periodu kod netretirane u odnosu na tretiranu grupu u oba segmenta dlake. Na osnovu ovih rezultata može se pretpostaviti da je prelazak kortikosterona u dlaku manjeg intenziteta nego prelazak kortizola, naročito ako se uzme u obzir odnos kortikosteron:kortizol u krvi. U uzorcima analiziranim u ovom radu, odnos kortikosteron:kortizol bio je od 1:1,7 do 1:4,4 što je u skladu sa podacima objavljenim od strane Venkateshu i Estergreen (1970). Pošto je odnos kortikosterona i kortizola u dlaci bio između 1:7,6 do 1:11,5 može se pretpostaviti da je dinamika prelaska kortikosterona u dlaku manja u odnosu na kortizol. Iz tog razloga, određivanje kortizola u dlaci može se uzeti kao pouzdan indikator za određivanje izloženosti hroničnom stresu. Pored toga, visoke vrednosti glukokortikosteroida u krvi, mleku i dlaci u P2 periodu kod obe ispitivane grupe poklapaju se sa vremenom uzorkovanja koje je bilo u sredini leta, odnosno avgustu mesecu. I kod netretirane i tretirane grupe vrednosti kortizola i kortikosterona u ovom periodu su bile značajno veće nego u drugim periodima. Ovakvi rezultati mogu

ukazivati na uticaj toplotnog stresa, jer su ti uzorci uzimani u najtoplijem periodu godine (Bova i sar. 2014). Ipak, u ovom periodu koncentracije kortizola i kortikosterona kod tretirane grupe bile su manje nego u netretiranoj, što potvrđuje da i pored dejstva visoke temperature, životinje koje su bile zaštićene od dejstva ektoparazite pokazale su manju izloženost stresu.

Poređenjem koncentracija glukokortikosteroida između netretirane i tretirane grupe u crnoj dlaci nisu ustanovljene značajne promene u koncentracijama tokom perioda uzorkovanja koje bi se mogle povezati sa uticajem antiiektoparazitika. Kod ljudi je ustanovljeno da se neke supstance više nakupljaju u tamnoj nego u svetloj kosi (González-de-la-Vara i sar. 2011). Za razliku od koncentracija glukokortikosteroida u crnoj dlaci koncentracija glukokortikosteroida u beloj dlaci je bila manja u periodima uzorkovanja kod tretirane grupe. Na osnovu ovoga moglo bi se zaključiti da je i ugradnja glukokortikosteroida različita u zavisnosti od boje dlake. Tako, poređenjem koncentracija kortizola između bele i crne dlake kod netretirane grupe nisu utvrđene značajne razlike, dok su u tretiranoj grupi utvrđene značajno manje koncentracije kortizola u beloj u odnosu na crnu dlaku. Ovako značajne razlike nisu utvrđene u koncentraciji kortikosterona između bele i crne dlake. Na osnovu ovih podataka moglo bi se zaključiti da je određivanje koncentracije kortizola u proksimalnom segmentu bele dlake najpouzdaniji biološki materijal za procenu izloženosti hroničnom stresu.

Iz rezultata korelacija kortizola, može se zaključiti da je značajno pozitivna korelacija između krvi i mleka kod netretirane grupe posledica brze promene u koncentraciji i prelasku kortizola iz krvi u mleko koja nastaje u uslovima pojačane aktivnosti HPA osovine. Ovakva značajno pozitivna korelacija se zadržava i u zbirnom prikazu kod tretirane i netretirane grupe. Ovakvi rezultati koji prikazuju značajno pozitivnu korelaciju između koncentracije kortizola u krvi i mleku kod netretirane grupe koja je izložena stresnim stimulusima su u skladu sa tvrdnjama drugih autora (Shutt i Fell, 1985; Verkerk i sar. 1996). Kod tretirane grupe nema značajne korelacije između koncentracije kortizola u krvi i mleku, jer tretman utiče na smanjivanje aktivnosti HPA osovine tako da kortizol prelazi iz krvi u mleko u mnogo manjem intenzitetu i njegov prelazak zavisi od dnevnog lučenja kortizola. Za razliku od kortizola, gde su utvrđene značajno pozitivne korelacije samo između krvi i mleka, značajne pozitivne korelacije kortikosterona su utvrđene kod netretirane grupe između krvi i dlake i mleka i dlake.

Ovo nam pokazuje da je dinamika prelaska kortikosterona u dlaku intenzivnija u odnosu na kortizol i da prati povećanje koncentracije kortikosterona u krvi i mleku. Odsustvo značajnih korelacija između koncentracija kortizola i kortikosterona u krvi i mleku potvrđuje različitu dinamiku promene njihove koncentracije u medijumima u kojima se njihova koncentracija brzo menja. Za razliku od toga, u dlaci je postojala značajna pozitivna korelacija između koncentracija kortizola i kortikosterona što objašnjava da vreme bitno utiče na dinamiku njihovog lučenja. Značajno pozitivnu korelaciju između kortizola i kortikosterona utvrdili su takođe Gong i saradnici (2015).

Zajedno sa praćenjem vrednosti koncentracije hormona kod oglednih životinja određivani su i pojedini biohemijski parametri krvi koji mogu biti promenjeni u stresnim stanjima. Između tretirane i netretirane grupe krava tokom perioda uzorkovanja nije bilo značajne razlike u vrednostima biohemijskih parametara krvi čije vrednosti su se nalazile u referentnim intervalima (Rosenberger, 1995). Jedino su vrednosti koncentracije globulina bile nešto više, što se može povezati sa činjenicom da krave koje su se više puta telile imaju nešto veću koncentraciju globulina (Cozzi i sar. 2011). Poznato je da se pojedini biohemijski parametri krvi mogu menjati kao odgovor na stresnu reakciju (Trevisi i Bertoni, 2009), međutim jačina i brojnost stresora kao i individualne razlike u reaktivnosti na stresore verovatno imaju presudni uticaj na njihovu promenu (Natelsen i sar. 1988; Bayford i sar. 1991). Prema tome, ekto paraziti verovatno nisu stresori najjačeg intenziteta, tako da oni ne dovode do značajnije promene biohemijskih parametara krvi.

Poznato je da ekto paraziti nanose velike ekonomske štete koje se pre svega ogledaju u gubitcima koji su vezani za smanjenje proizvodnje mleka (Jonsson i Mayer, 1999). Iz grafikona 2 koji pokazuje kretanje prosečne mlečnosti po periodima uzorkovanja zapaža se da je kod obe grupe došlo do pada mlečnosti u periodu P2 kada su i koncentracije glukokortikosteroida bile najveće u svim biološkim medijumima. Međutim, nakon ovog perioda kod tretirane grupe je došlo do povećanja mlečnosti dok kod netretirane nismo imali takvo povećanje. Iako nije bilo značajne razlike u prosečnoj mlečnosti između ispitivanih grupa, treba istaći da je grupa krava koja je tretirana antiektoparazitikom imala veću prosečnu mlečnost tokom celog perioda ogleda. Ovakvi rezultati za veću prosečnu mlečnost kod tretirane grupe krava su u skladu sa rezultatima objavljenim od strane Taylora i saradnika (2012), koji su takođe utvrdili da krave koje

su izložene dejstvu ektoparazita imaju nižu prosečnu proizvodnju mleka u odnosu na tretirane krave.

Takođe, tokom oglada praćen je i kvalitet mleka određivanjem hemijskog sastava mleka kao i broja somatskih ćelija. Poznato je da neka stresna stanja kao što je toplotni stres mogu uticati na kvalitet mleka tako što dolazi do smanjivanja sadržaja najvažnijih sastojaka mleka, sadržaja mlečne masti i proteina (Peyman i Habib, 2012). Ipak u rezultatima hemijskog sastava mleka prikazanim u ovom radu nije bilo razlika između netretirane i tretirane grupe krava. Međutim, zapaža se veći broj somatskih ćelija u mleku kod obe grupe, što ukazuje na prisutnost subkliničkih mastitisa, a takođe dodatno objašnjava i veću koncentraciju globulina u krvi (Bobbo i sar. 2017). Kao i kod biohemijskih parametara krvi, nepostojanje razlike u između grupa govori nam da se najverovatnije radi o tome da brojnost ektoparazita i intenzitet njihov stresnog delovanja (Bayford i sar. 1991), nisu dovoljni da dovedu do značajnih razlika u sastavu mleka između netretirane i tretirane grupe krava. Dejstvo stresa koji izazivaju ektoparaziti je najverovatnije umerenog intenziteta koji podiže vrednosti kortizola, ali ne preko nekih fizioloških vrednosti, tako da životinje na to reaguju prilagođavanjem i savladavaju stres trošeći samo rezerve organizma ne narušavajući značajno funkcionisanje ostalih organskih sistema (Moberg i Mench, 2000) .

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja sprovedenih u ovoj doktorskoj disertaciji mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Validacijom ELISA metode za određivanje koncentracije kortizola i kortikosterona u dlaci utvrđeno je da se svi izmereni parametri validacije nalaze u okviru limita određenih u odluci Evropske komisije iz 2002. godine (*Commission decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results*), na osnovu čega se može zaključiti da se navedena metoda sa visokom pouzdanošću može koristiti za određivanje koncentracija ovih hormona u dlaci.
2. Na bazalne vrednosti koncentracija kortizola u krvi, mleku i dlaci značajnog uticaja ima rasa, dok laktacija nema uticaja. U bazalnim uslovima nije utvrđena značajna razlika između koncentracija kortizola u proksimalnim i distalnim segmentima, kao ni između bele i crne dlake, što ukazuje da se oba segmenta dlake i dlake različitih boja mogu podjednako pouzdano koristiti za procenu fiziološkog stanja krava rase holštajn. Utvrđena je značajna razlika između koncentracije kortizola u opranim i neopranim uzorcima dlake, što ukazuje da je kortizol prisutan u znoju i loju koji oblaže spoljnu površinu dlake.
3. Krave holštajn rase držane u otvorenom sistemu su tokom letnjeg perioda značajno izložene delovanju ektoparazita, odnosno kosmopolitski rasprostranjenoj vrsti muva *Stomoxys calcitrans*, koja je najviše zastupljena na donjem delu nogu, leđima i vratu i koja izaziva porast koncentracije indikatora stresa (kortizola i kortikosterona u krvi, mleku i dlaci).
4. Tretman krava anti-ektoparazitikom pre perioda najveće infestacije muvama sprečio je stresnu reakciju organizma, s obzirom da se kod tretirane grupe tokom celog perioda ispitivanja koncentracija kortizola i kortikosterona u krvi zadržala na bazalnim vrednostima, dok je kod netretirane grupe tokom perioda značajno rasla.

5. Kod tretirane grupe koncentracija kortikosterona u mleku se tokom vremena zadržala u okviru bazalnih vrednosti, dok se kod netretirane grupe značajno povećavala. Kako u mleku nije zapažen uticaj tretmana na koncentraciju kortizola, može se zaključiti da je koncentracija kortikosterona u mleku pouzdaniji parametar za procenu izoženosti stresu u odnosu na kortizol.
6. Tretman antiektoparazitikom uticao je na značajno smanjenje koncentracije kortizola u proksimalnom segmentu dlake, tokom vremena, dok u distalnom nije bilo promena, tako da se može zaključiti da je za kontinuirano praćenje izloženosti stresu tokom dužeg vremenskog perioda pouzdanije korišćenje proksimalnog u odnosu na distalni deo dlake. Koncentracija kortikosterona nije se značajno menjala kod tretirane u odnosu na netretiranu grupu, zbog čega je određivanje koncentracije kortizola pouzdaniji indikator procene stresa u dlaci.
7. Poređenjem promene koncentracije kortizola u crnoj i beloj dlaci tokom oglada, utvrđeno je da je kod tretirane grupe došlo do značajnog pada koncentracije kortizola tokom vremena samo u beloj dlaci, što nije bio slučaj kod netretirane grupe. Može se stoga pretpostaviti da je bela dlaka pogodnija za procenu izloženosti stresu u dužem vremenskom periodu.
8. Utvrđena je značajna pozitivna korelacija između koncentracije kortizola u krvi i mleku, kao i između koncentracija kortikosterona utvrđenih u sva tri biološka materijala, ukazujući da dinamika prelaska kortizola u mleko, odnosno kortikosterona u mleko i dlaku prati promenu koncentracije ovih indikatora stresa u krvi. Kortizol i kortikosteron pokazuju značajnu pozitivnu korelaciju samo u dlaci, ukazujući na ujednačenu dinamiku nakupljanja ova dva indikatora stresa u dlaci.
9. Tretman antiektoparazitikom nije uticao na promenu biohemijskog sastava krvi, hemijskog sastava, kvaliteta mleka, kao ni na mlečnost, iako je prosečna mlečnost tokom celog perioda oglada bila numerički veća kod tretirane grupe.

7. LITERATURA

1. *Baldacchino F, Muenworn V, Desquesnes M, Desoli F, Charoenviriyaphap, T, Duvallat G*, 2013a, Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review, *Parasite*, 20, 26.
2. *Baldacchino F, Porciani A, Bernard C, Jay-Robert P*, 2013b. Spatial and temporal distribution of tabanidae in the pyrenees mountains: influence of altitude and landscape structure, *Bull Entomol Res*, 104, 1-11.
3. *Bayford RL, Craig ME, Crosby BL*, 1992, A review of on ectoparasites and their cattle production, *J Anim Sci*, 70, 597-602.
4. *Bennett A, Hayssen V*, 2010, Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences, *Dom Anim Endocrinol*, 39, 171-80.
5. *Bertoni G, Trevisi E, Lombardelli R, Bionaz M*, 2005, Plasma cortisol variations in dairy cows after some usual or unusual manipulations, *Ital J Anim Sci*, 4, 200-202.
6. *Bobbo T, Fiore E, Giancesella M, Morgante M, Gallo L, Ruegg PL, Bittante G, Cecchinato A*, 2017, Variation in blood serum proteins and association with somatic cell count in dairy cattle from multi-breed herds, *Animal*, <https://doi.org/10.1017/S1751731117001227>
7. *Bova TL, Chiavaccini L, Cline GF, Hart CG, Matheny K, Muth AM, Voelz BE, Kesler D, Memili E*, 2014, Environmental stressors influencing hormones and systems physiology in cattle, *Reprod Biol Endocrinol*, 12, 58.
8. *Bram RA*, 1994, Integrated control of ectoparasites, *Rev sci tech Off int Epiz*, 13, 1357-1365.
9. *Bremel R, Gangwer M*, 1978, Effect of adrenocorticotropin injection and stress on milk cortisol content, *J Dairy Sci*, 61, 1103-1108.
10. *Breuner CW, Orchinik M*, 2002, Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates, *J Endocrinol*, 175, 99-112.

11. *Briskin C, O'Molloy B*, 2010, Hormone action in mammary gland, *Cold Spring Harbor Persp Biol*, 2, 1-15.
12. *Broom D*, 2003, Transport stress in cattle and sheep with details of physiological, ethological and other indicators, *Dtsch Tierarztl Wschr*, 110, 83-88.
13. *Broom DM*, 2006, Behaviour and welfare in relation to pathology, *Appl Anim Behav Sci*, 97,73-83.
14. *Broom DM, Kirkden RD*, 2004, Welfare, stress, behaviour and pathophysiology, In: *Veterinary pathophysiology, Blackwell, Ames*, 337-369.
15. *Brown RE*, 1994, An introduction to neuroendocrinology, *Cambridge University Press, Great Britain*.
16. *Burnett TA, Augusto MLM, Bruna FS, Nadalin A, Tahmasbi A, Veira DM, Cerri RLA*, 2014, Factors affecting hair cortisol concentrations in lactating dairy cows, *J Dairy Sci*, 97, 1-6.
17. *Bustamante HA, Rodríguez AR, Herzberg DE, Werner MP*, 2015, Stress and pain response after oligofructose induced-lameness in dairy heifers, *J Vet Sci*, 16, 405-411.
18. *Bušatlija I*, 2004. Geografija -Zemljopis. *Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Sarajevo*.
19. *Byford RL, Craig ME, Crosby BL*, 1992, A Review of on ectoparasites and their cattle production, *J Anim Sci*, 70, 597-602.
20. *Campbell JB, Skoda SR, Berkebile DR, Boxler DJ, Thomas GD, Adams DC, Davis R*, 2001, Effects of stable flies (Diptera: Muscidae) on weight gains of grazing yearling cattle, *J Econ Entom*, 94, 780-783.
21. *Catangui MA, Campbell JB, Thomas GD, Boxler DJ*, 1997 ,Calculating economic injury levels for stable flies (Diptera: Muscidae) on feeder heifers. *J Econ Entom*, 90, 6-10.

22. *Chen Y, Arsenault R, Napper S, Griebel P, 2005, Models and methods to investigate acute stress responses in cattle, Animals, 5, 1268-1295.*
23. *Christensen CM, 1982, External parasites of dairy cattle, J Dairy Sci, 65, 2189-2193.*
24. *Christison G, Johnson HD, 1972, Cortisol turnover in heat-stressed cows, J Anim Sci, 35, 1005-1010.*
25. *Comin A, Peric T, Corazzin M, Veronesi MC, Meloni T, Zufferli V, Cornacchia G, Prandi A, 2013, Hair cortisol as a marker of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation in Friesian dairy cows clinically or physiologically compromised, Livestock Sci, 152, 36-41.*
26. *Comin A, Prandi A, Peric T, Peric T, Corazzin M, Dovier S, Bovolenta S, 2011, Hair cortisol levels in dairy cows from winter housing to summer highland grazing, Livestock Sci, 138, 69-73.*
27. *Cozzi G, Ravarotto R, Gottardo F, Stefani AL, Contiero B, Moro L, Brscic M, Dalvit P, 2011, Short communication: Reference values for blood parameters in Holstein dairy cows: Effects of parity, stage of lactation, and season of production, J Dairy Sci, 94, 3895-3901.*
28. *Davenport MD, Tiefenbacher S, Lutz CK, Novak MA, Meyer JS, 2006 Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques, Gen Comp Endocrinol, 147, 255-261.*
29. *Denning SS, Washburn SP, Watson DW, 2014, Development of a novel walk-through fly trap for the control of horn flies and other pests on pastured dairy cows, J Dairy Sci, 97 4624-4631.*
30. *Dowling DF, 1958, Seasonal changes in coat characters in cattle, Proceed Australian Socie Anim Prod, 2, 69-80.*
31. *Du Preez JH, 2000, Parameters for the determination and evaluation of heat stress in dairy cattle in South Africa, J Vet Res, 67, 263-271.*

32. *Etim NN, Oguike MA*, 2014, environmental and management stressors: implications for reproductive and productive performances of farm animals in the tropics. *J Agric Sustain*, 5, 153-170.
33. *European Commission Decision*, 2002, Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, 221 8-36.
34. *Fell LR, Shutt DA*, 1986, Adrenocortical response of calves to transport stress as measured by salivary cortisol, *Can J Anim Sci*, 662, 637-641 .
35. *Fink G, Rosie R, Sheward WJ, Thomson E, Wilson H*, 1991, Steroid control of central neuronal interactions and function, *J Ster Bioch Molec Biol*, 40, 123-132.
36. *Fox L, Butler WR, Everett RW, Natzke RP*, 1981, Effect of adrenocorticotropin on milk and plasma cortisol and prolactin concentrations, *J Dairy Sci*, 64, 1974-1803.
37. *Fukasawa M, Tsukada M, Kosako T, Yamanda A*, 2008, Effect of lactation stage, season and parity on milk cortisol concentration in Holstein cows, *Livestock Sci*, 113 , 280-284.
38. *Gayrard V, Alvinerie M, Toutain PL*, 1996, Interspecies variations of corticosteroid-binding globulin parameters, *Domest Anim Endocrinol* , 13:35-45.
39. *Ghassemi Nejad J, Kim BW, Lee BH, Sung KI*, 2017 Coat and hair color: hair cortisol and serotonin levels in lactating Holstein cows under heat stress conditions, *Anim Sci J*, 88, 190-194.
40. *Gleixner A, Meyer HD, Heinrich H*, 1997, Detection of estradiol and testosterone in hair of cattle by HPLC/EIA, *Fresenius' J Analyt Chem*, 357, 1198-1201.

41. Golden SH, Wand GS, Malhotra S, Kamel I, Horton K, 2011, Reliability of hypothalamic-pituitary-adrenal axis assessment methods for use in population-based studies, *Europ J Epidemiol*, 26, 511-525.
42. Gong S, Miao YL, Jiao GZ, Sun MJ, Li H, Lin J, Luo MJ, Tan JH, 2015, dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice, *PLoSONE* , 10 (2): e0117503
43. González-de-la-Vara MR, Valdez RA, Lemus-Ramirez V, Vázquez-Chagoyán JC, Villa-Godoy A, Romano MC, 2011, Effects of adrenocorticotrophic hormone challenge and age on hair cortisol concentrations in dairy cattle, *Can J Vet Res*, 75, 216-221.
44. Gow R, Thomason S, Rieder M, Van Uum S and Koren G, 2010, An assessment of cortisol analysis in hair and its clinical applications, *Forensic Sci Int*, 196, 32-37.
45. Grandin T, 1997, Assessment of stress during handling and transport, *J Anim Sci*, 75, 249-257.
46. Greenwood PL, Shutt DA, 1992, Salivary and plasma cortisol as a index of stress in goats, *Aust Vet J*, 69, 161-163.
47. Gwazdauskas FC, Thatcher WW, Wilcox CJ, 1972, Adrenocorticotropin alteration of bovine peripheral plasma concentrations of cortisol, corticosterone, and progesterone, *J Dairy Sci*, 55, 1165-1169.
48. Gyax L, Neuffer I, Kaufmann C, Hauser R, Wechsler B, 2006, Milk cortisol concentration in automatic milking systems compared with auto-tandem milking parlors, *J Dairy Sci*, 89, 3447-3454.
49. Hall SJG, Schmidt B, Broom DM, 1997, Feeding behaviour and the intake of food and water by sheep after a period of deprivation lasting 14 h, *Anim Sci*, 64, 105-110.
50. Harkey MR, 1993, Anatomy and physiology of hair, *Forensic Sci Int*, 63 9-18.

51. Higashiyama Y, Komatsu T, Fukasawas M, Higashiyama M, Ikeda K, Ueda Y, Akiyama F, Asakuma S, 2014, Comparison of urinary cortisol levels in Holstein and Japanese shorthorn cows in response to breeding system and heat stress, *J Anim Sci Advan*, 4, 1009-1016.
52. Higashiyama Y, Narita H, Nashiki M, Higashiyama M, Kannol T, 2005, Urinary cortisol levels in Japanese shorthorn cattle before and after the start of a grazing season, *Asian-Aust J Anim Sci*, 18, 10, 1430-1434.
53. Hopster H, van der Werf JT, Blokhuis HJ, 1998, Stress enhanced reduction in peripheral blood lymphocyte numbers in dairy cows during endotoxin-induced mastitis, *Vet Immunol Immunopathol*, 66, 83-97.
54. Hristov S, Đurđević Đ, Grubić G, Bogdanović V, Vidić R, Bokan Lj, 1994, Koncentracija kortizola u krvnom serumu goveda, *Vet glasnik*, 48, 853-859.
55. Hudson S, Mullord M, Whittlestone WG, Payne E, 1975, Diurnal variations in blood cortisol in the dairy cow, *J Dairy Sci*, 58, 30-33.
56. Jonsson NN, Mayer DG, 1999, Estimation of the effects of buffalo fly (*Haematobia irritans exigua*) on the milk production of dairy cattle based on a meta-analysis of literature data, *Medic Vet Entomol*, 13, 372-376.
57. Kassab AY, Mohammed AA, 2014, Ascorbic acid administration as anti-stress before transportation of sheep, *Egyptian J Anim Prod*, 51, 19-25.
58. Kent JE, Ewbank R, 1986, The effect of road transportation on the blood constituents and behaviour of calves. III. Three months old, *Br Vet J*, 142, 326-335.
59. Kirschbaum C, Tietze A, Skoluda N, Dettenborn L, 2011, Hair as a retrospective calendar of cortisol production-increased cortisol incorporation into hair in the third trimester of pregnancy, *Psychoneuroendocrinology*, 34, 32-37.
60. Kreuzer M, Langhans W, Sutter F, 1998, Metabolic response of early lactating cows exposed to transport and high altitude grazing conditions, *Anim Sci*, 67, 237-248.

61. Lepková R, Sterc J, Vecerek V, Doubek J, Kruzíková K, Bedánová I, 2007, Stress responses in adult cattle due to surgical dehorning using three different types of anaesthesia, *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 120, 465-469.
62. Lozano GA, 1988, Parasitic stress and self-medication in wild animals, *Adv Study Behav*, 27, 291-317.
63. Lysyk JT, 2011, Arthropods associated with livestock grazing systems. In: Floate KD, Arthropods of Canadian Grasslands (Volume 2): inhabitants of a changing landscape, 45-69. *Biological Survey of Canada*.
64. Macadam WR, Eberhart RJ, 1972, Diurnal variation in plasma corticosteroid concentration in dairy cattle, *J Dairy Sci*, 55, 12, 1792-1795.
65. Mackenzie AM, Drennan M, Rowan TG, Dixon JB, Carter SD, 1997, Effect of transportation and weaning on humoral immune responses of calves, *Res Vet Sci*, 63, 227-230.
66. McDonald LE, Pineda MH, 1989, Veterinary endocrinology and reproduction, *Lea and Febrieger, Philadelphia, 4th edition*.
67. McGuire MA, Beede DK, Collier RJ, Buonomo FC, DeLorenzo MA, Wilcox CJ, Huntington GB, Reynolds CK, 1991, Effects of acute thermal stress and amount of feed intake on concentrations of somatotropin, insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II, and thyroid hormone in plasma of lactating Holstein cows, *J Anim Sci*, 69, 2050-2056.
68. Meyer SJ, Novak AM, 2012, Minireview: Hair cortisol: a novel biomarker of hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity. *Endocrinology*, 153, 4120-4127.
69. Minton JE, 1994, Function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the sympathetic nervous system in models of acute stress in domestic farm animals, *J Anim Sci*, 72, 1891-1898.
70. Moberg GP, Mench JA, 2000 The Biology of animal stress, *CAB International, Wallingford, UK*.

71. *Mormède P, Andanson S, Aupérin B, Beerda B, Guémené D, Malmkvist J, Manteca X, Mantauffel G, Prunet P, van Reenen CG, Richard S, Veissier I, 2007, Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare, *Physiol Behav*, 92, 317-339.*
72. *Morrow CJ, Kolver ES, Verkerk GA, Matthews LR, 2000, Urinary corticosteroids: an indicator of stress in dairy cattle, *Proc New Zeal Soc Anim Prod*, 60, 218-221.*
73. *Morrow CJ, Kolver ES, Verkerk GA, Matthews LR, 2002, Fecal glucocorticoid metabolites as a measure of adrenal activity in dairy cattle, *General Comp Endocrinol*, 126, 229-241.*
74. *Möstl E, Messman S, Bagu E, Robia C, Palme R, 1999, Measurement of glucocorticoid metabolite concentrations in faeces of domestic livestock, *J Vet Med A*, 46, 621-631.*
75. *Mudroň P, J Rehage, HP Sallmann, M Höltershinken and H Scholz, 2005. Stress response in dairy cows related to blood glucose, *Acta Vet Brno*, 74, 37-42.*
76. *Mullens BA, Lii KS, Mao Y, Meyer JA, Peterson NG, Szijj CE, 2006, Behavioral responses of dairy cattle to the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, in an open field environment, *Med Vet Entomol*, 20, 122-137.*
77. *Nanda AS, Ward WR, Dobson H, 1989, Effects of naloxone on the oestradiol-induced LH surge and cortisol release in transported cows, *J Reprod Fertil*, 87, 803-807.*
78. *Natelsen BH, Ottenweller JE, Cook JA, Piterman D, McCarty R, Tapp WN, 1988, Effect of stressor intensity on habituation of the adrenocortical stress response, *Physiol Behav*, 43, 41-46.*
79. *Negrao JA, Porcionato MA, Passille AM, Rushen J, 2004. Cortisol in saliva and plasma of cattle after ACTH administration and milking, *J Dairy Sci*, 87, 1713-1718.*

80. Nikolić JA, Šamanc H, Begović J, Krsmanović J, Aleksić S, Mišćević B, Huszenicza GY, Damjanović Z, 1998, Basal serum cortisol concentration in cattle, *Acta vet*, 48, 265-276.
81. Osawa T, Nakao T, Moriyoshi M, Nakada K, 2000, Effects of dystocia, retained placenta and body condition on plasma b-endorphin profile in periparturient dairy cows, *J Reprod Develop*, 46, 23-30.
82. Palme R, 2012, Monitoring stress hormone metabolites as a useful, non-invasive tool for welfare assessment in farm animals, *Anim Welf*, 21, 330-337.
83. Palme R, Robia C, Mebmann S, Hofer J, Mostl E, 1999, Measurement of faecal cortisol metabolites in ruminants: a non-invasive parameter of adrenocortical function, *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 86, 237-241.
84. Pejman A, Habib AS, 2012, Heat stress in dairy cows (A Review), *Res Zoolog*, 2, 31-37.
85. Peric T, Comin A, Corazzin M, Montillo M, Cappa A, Campanile G, Prandi A, 2013, Hair cortisol concentrations in Holstein-Friesian and crossbreed F1 heifers, *J Dairy Sci*, 96, 3023-3027.
86. Pragst F, Balikova MA, 2006, State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse, *Clin Chim Acta*, 370, 17-49.
87. Prodanović R, Kirovski D, Vujanac I, Đurić M, Korićanac G, Vranješ-Đurić S, Ignjatović M, Šamanc H, 2013, Insulin responses to acute glucose infusion in Busa and Holstein-Friesian cattle breed during the peripartum period: comparative study, *Acta Vet Beograd*, 63, 373-384.
88. Riad-Fahmy D, Read GF, Walker RF, Griffiths K, 1982, Steroids in saliva for assessing endocrine function, *Endocrinol Rev*, 4, 367-395.
89. Rosenberger G. 1995. Clinical Examination of Cattle. *Science Ltd. Blackwell*

90. Roth JA, Kaeberle ML, 1993, Suppression of neutrophil and lymphocyte function induced by a vaccinal strain of bovine viral diarrhoea virus with and without the administration of ACTH, *Am J Vet Res*, 44, 2366-2372.
91. Roth LSV, Faresjö Å, Theodorsson E, Jensen P, 2016, Hair cortisol varies with season and lifestyle and relates to human interactions in German shepherd dogs, *Sci rep*, 6,19631, 1-7.
92. Russell E, Koren G, Rieder M, Van Uum S, 2012, Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions, *Psychoneuroendocrinology*, 37, 589-601.
93. Saco Y, Fina M, Giménez M, Pato R, Piedrafita J, Bassols A, 2008, Evaluation of serum cortisol, metabolic parameters, acute phase proteins and faecal corticosterone as indicators of stress in cows, *Vet J*, 177, 439-441.
94. Salaberger T, Millard M, El Makarem S, Möstl E, Grünberger V, Krametter-Frötscher R, Wittek T, Palme R, 2016, Influence of external factors on hair cortisol concentrations, *Gen comp endocrinol*, 233, 73-78.
95. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU, 2000, How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions, *Endocrinol Rev*, 21, 55-89.
96. Sauve B, Koren G, Walsh G, Tokmakejian S, VanUum SHM, 2007, Measurement of cortisol in human hair as a biomarker of systemic exposure, *Clin Invest Med*, 30,183-191.
97. Schutt DA, Fell LR, 1985, Comparison of total and free cortisol in bovine serum and milk or colostrum, *J Dairy Sci*, 68, 1832-1834.
98. Schwalm JW, Tucker HA, 1978, Glucocorticoids in mammary secretions and blood serum during reproduction and lactation and distributions of glucocorticoids, progesterone and estrogens in fractions of milk, *J Dairy Sci*, 61, 550-560.
99. Scorrano F, Carrasco J, Pastor-Ciurana J, Belda X, Rami-Bastante A, Bacci ML, Armario A, 2015, Validation of the long-term assessment of hypothalamic-

- pituitary–adrenal activity in rats using hair corticosterone as a biomarker, *FASEB J*, 29, 859-867.
100. Sgorlon S, Fanyago M, Guiatti D, Gabai G, Stradaoli G, Stefanon B, 2015, Factors affecting milk cortisol in mid lactating dairy cows, *BMC Vet Res*, 11 259, 1-8.
 101. Sharpley CF, McFarlan JR, Slominski A, 2013, Stress-linked cortisol concentrations in hair: what we know and what we need to know, *Rev Neurosci*, 23, 111-121.
 102. Showler AT, Osbrink WLA, 2015, Stable Fly, *Stomoxys calcitrans* (L.), dispersal and governing factors, *Internat J Insect Sci*, 7, 19-25.
 103. Skogerboe TL, Smith LL, Karle VK, Derozier CL, 2000, The persistent activity of doramectin pour-on against biting and sucking louse infestations of cattle, *Vet Parasitol*, 87, 183-192.
 104. Skovgard H, Steenberg T, 2002, Activity of pupal parasitoids of the stable fly *Stomoxys calcitrans* and prevalence of entomopathogenic fungi in the stable fly and the house fly *Musca domestica* in Denmark, *Bio Control*, 47, 45-60.
 105. Stout PR, Ruth JA, 2001, 3H-Nicotine, 3-flunitazepam, and 3H-cocaine incorporation into melanin: A model for the examination of drug-melanin interactions, *J Analyt Toxicol*, 25, 607-611.
 106. Sylvester SP, Mellor DJ, Stafford KJ, Bruce RA, Ward RN, 1998, Acute cortisol responses of calves to scoop dehorning using local anaesthesia and/or cautery of the wound, *Aust Vet J*, 76, 118-122.
 107. Šamanc H, Kirovski D, 2008, Adrenokortikalni sistem goveda, *Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd, TEODIS PRESS*.
 108. Šamanc H, Nikolić JA, Bugarski D, Kulcsar M, Ivanov I, Huszenicza Gy, 1999, Glycemia, glucocorticoids and adrenocortical reserve in postpartum dairy cows, *Acta Vet*, 49, 281-288.

109. Tallo-Parra O, Manteca X, Sabes-Alsina M, Carbajal A, Lopez-Bejar M, 2015, Hair cortisol detection in dairy cattle by using EIA: protocol validation and correlation with faecal cortisol metabolites, *Animal*, 9: 1059-1064.
110. Tanritanir P, Ozadal N, Ragbetli C, Yoruk I, Ceylan E, Derger S, 2009, Some biochemical parameters and vitamins in the hairy goats naturally mix-infested with endo and ecto parasites (lice (*linognathus africanus*) and *Trichostrongylidae* sp.), *J Anim Vet Advan*, 8, 590-594.
111. Taves MD, Gomez-Sanchez CE, Soma KK, 2011 Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function, *American J Physiol Endocrino Metabol*, 301, E11-E24.
112. Taylor DB, Berkebile DR, 2006. Comparative efficiency of six stable fly traps. *J Economic Entomol*, 99, 1415-1419.
113. Taylor DB, Moon RD, Mark DR, 2012, Economic impact of stable flies (Diptera: Muscidae) on dairy and beef cattle production, *J Med Entomol*, 49, 198-209.
114. Trevisi E, Bertoni G, 2009, Some physiological and biochemical methods for acute and chronic stress evaluation in dairy cows, *Ital J Anim Sci*, 8, 265-286.
115. Trevisi E, Lombardelli R, Bionaz M, Bertoni G, 2005, Plasma cortisol level in relation to welfare conditions in dairy farms. *56th EAAP Annual Meeting, June 5-8 2005, Uppsala, Sweden*.
116. Tucker HA, Schwalm JW, 1977, Glucocorticoids in mammary tissue and milk, *J Anim Sci*, 45, 627-634.
117. Uarquin DG, Meyer JS, Cardenas FP, Rojas MJ, 2016, Effect of overcrowding on hair corticosterone concentrations in juvenile male wistar rats, *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 55, 749-755.
118. Veerkamp RF, Beerda B, Van der Lende T, 2003, Effects of genetic selection for milk yield on energy balance, levels of hormones, and metabolites in lactating cattle, and possible links to reduced fertility, *Livest Prod Sci*, 83, 257-275.
119. Venkataseshu GK, Estergreen VL, 1970, Cortisol and corticosterone in bovine plasma, *J Dairy Sci*, 53, 480-483.

120. Verkerk GA, Phipps AM, Carragher JF, Matthews LR, Stelwagen K, 1998, Characterisation of milk cortisol concentrations as a measure of short-term stress responses in lactating dairy cows, *Animal Welfare*, 7, 77-86.
121. Verkerk GA, Phipps AM, Matthews LR, 1996, Milk cortisol concentrations as an indicator of stress in lactating dairy cows, *Proceed New Zealand Society Anim Produc*, 56, 77-79.
122. Webster AJF, 1983, Environmental stress and the physiology, performance and health of ruminants, *J Anim Sci*, 57, 1584-1593.
123. Wester LV, van der Wulp NRP, Koper JW, de Rijke YB, van Rossum EFC, 2016, Hair cortisol and cortisone are decreased by natural sunlight, *Psychoneuroendocrinology*, 72, 94-96.
124. Wise ME, Armstrong DV, Huber JT, Hunter R, Wiersma F, 1998, Hormonal alterations in the lactating dairy cow in response to thermal stress, *J Dairy Sci*, 71, 2480-2485.

Biografija

Sreten Nedić je rođen 12. juna 1987. godine u Gradačcu, Bosna i Hercegovina. Osnovnu školu završio je u Gornjoj Slatini, a srednju Poljoprivredno i medicinsku školu, smer Veterinarski tehničar završio je u Bijeljini. Školske 2006/2007 upisao je Fakultet veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, koji je završio školske 2011/2012 godine sa prosečnom ocenom 8,78. Tokom osnovnih studija bio je stipendista opštine Šamac.

Po završetku osnovnih studija, upisuje doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, na kojima je položio sve ispite predviđene studijskim programom sa prosečnom ocenom 9,50.

Od 2017. godine zaposlen je kao asistent na Katedri za bolesti papkara, Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu. Učestvovao je na projektu "Procjena stresa kod krava utvrđivanjem koncentracije glukokortikosteroida iz bioloških uzoraka dobijenih neinvazivnim tehnikama", koji je finansiran od strane Ministarstva nauke i tehnologije Republike Srpske. U okviru mobilnosti studenata boravio je na usavršavanju na Veterinarskom fakultetu u Ljubljani u trajanju od 7 dana. Do sada je učestvovao na više naučno-stručnih skupova i objavio sam ili kao koautor veći broj radova od čega 2 u časopisima međunarodnog značaja (M22 i M23 kategorije).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани Сретен Недић

број уписа 16/13

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Одређивање концентрације кортизола и кортикостерона у длаци и млеку
крава као индикатора стреса у условима третмана антиектопаразитицима

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 22. 11. 2017.

Недић Сретен

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Сретен Н. Недић _____

Број уписа _____ 16/13 _____

Студијски програм _____ докторске академске студије _____

Наслов рада Одређивање концентрације кортизола и кортикостерона
у длаци и млеку крава као индикатора стреса у условима третмана
антиектопаразитицима

Ментор 1 _____ др Данијела Кировски _____

Ментор 2 _____ др Томаж Сној _____

Потписани _____ Сретен Недић _____

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 22. 11. 2017.

Сретен Недић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Одређивање концентрације кортизола и кортикостерона у длаци и млеку
крава као индикатора стреса у условима третмана антиектопаразитицима

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 22. 11. 2017.

Негута Срџић

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.