

3
4
5 IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

6
7 I PODACI O KOMISIJI:

8
9
10 1. Datum i naziv organa koji je imenovao komisiju:

11 18.10.2017. godine, 180. sednica Nastavno-naučnog veća Fakulteta veterinarske
12 medicine Univerziteta u Beogradu

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

- 18 • prof. dr Danijela Kirovski, redovni profesor, Fiziologija, 2016. godina, Fakultet
19 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
- 20
- 21 • doc. dr Tomaž Snoj, docent, Farmakologija sa toksikologijom, 2013. godina,
22 Veterinarski fakultet Univerziteta u Ljubljani
- 23
- 24 • doc. dr Ivan Vujanac, docent, Bolesti papkara, 2012. godina, Fakultet veterinarske
25 medicine Univerziteta u Beogradu
- 26
- 27 • dr Goran Korićanac, naučni savetnik, 2013. godina, Prirodno-matematičke nauke-
28 molekularna endokrinologija, Institut za nulearne nauke «Vinča» Univerziteta u
29 Beogradu
- 30
- 31 • dr Željko Sladojević, naučni saradnik, 2016. godina, Biotehničke nauke -
32 veterinarstvo, JU Veterinarski institut Republike Srpske “dr Vaso Butozan”, Banja
33 Luka, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina
- 34

35 II PODACI O KANDIDATU:

36
37 1. Ime, ime jednog roditelja, prezime:

38 Sreten, Nikola, Nedić

39 2. Datum rođenja, opština, Republika:

40 12.06.1987. Gradačac, Bosna i Hercegovina

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

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

43 III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE: Određivanje koncentracije kortizola i
44 kortikosterona u dlaci i mleku krava kao indikatora stresa u uslovima tretmana
45 antiektoparazitocima

46
47 IV PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broja strana poglavlja, slika, šema,
48 grafikona i sl.): Doktorska disertacija kandidata Sretena Nedića napisana je na 81 stranu i
49 sadrži sledeća poglavlja: Uvod (2 strane), Pregled literature (22 strane), Cilj i zadaci
50 istraživanja (1 strana), Materijal i metode rada (9 strana), Rezultati istraživanja (20 strana),
51 Diskusija (12 strana), Zaključci (2 strane), Literatura (13 strana). Poslednje 4 strane su
52 biografija i izjave. Zahvalnica i kratak sadržaj na srpskom i engleskom jeziku nalazi se u prvih
53 7 strana. U disertaciji se nalaze 22 tabele u poglavlju Rezultati, 5 slika (4 slike u poglavlju
54 Pregled literature i 1 slika i poglavlju Materijal i metode) i 2 grafikona u poglavlju Rezultati.

55
56 V VREDNOVANJE POJEDINIH DELOVA DOKTORSKE DISERTACIJE (dati kratak opis
57 svakog poglavlja disertacije: uvoda, pregleda literature, cilja i zadataka istraživanja,
58 materijala i metoda, rezultata, diskusije, spiska referenci):

59

1 U **Uvodu** kandidat navodi da je proces selekcije u stočarstvu koji je usmeren ka visokoj
2 proizvodnji mleka doveo do toga da se mnogi procesi u organizmu među kojima i reakcija na
3 stres podređuju visokoj proizvodnji mleka. Takođe, navodi se da su visoko-proizvodne životinje izložene sve većem
4 intenzivan način držanja doveli do toga da su visoko-proizvodne životinje izložene sve većem
5 broju stresora. Stresori koji mogu uticati na goveda podeljeni su prema poreklu na abiotičke i
6 biotičke stresore. Svi ovi stresori mogu delovati kratkoročno izazivajući akutni stres na koji
7 životinje reaguju intenzivno vidljivom manifestacijom ili dugoročno izazivajući hronični stres
8 koji nema intenzivan odgovor ali zbog dugog trajanja može dovesti do značajnog poremećaja
9 u funkcionisanju mnogih organskih sistema. Dejstvo ekto parazita kao biotičkih stresora
10 obično dugo traje te oni na taj način izazivaju hronični stres kod životinja. Na osnovu saznanja
11 da ekto paraziti izazivaju stres kod visoko-mlečnih krava smatra se da bi se njihovom
12 eliminacijom sprečila stresna reakcija i omogućilo nesmetano odvijanje proizvodnje. U novije
13 vreme, za kontrolu ekto parazita koristi se individualni tretman životinja upotrebom *pour-on*
14 anti ekto parazitskih sredstava. Za praćenje stepena izloženosti stresu kod goveda najvažnije
15 je određivanje nivoa hormona stresa, kortizola i kortikosterona. Od velike važnosti je odabir
16 biološkog materijala u kome se određuju indikatori stresa za procenu izloženosti stresu. Svi
17 biološki materijali se dele na one u kojima se može procenjivati uticaj akutnog stresa (krv,
18 pljuvačka, urin, mleko) i one u kojima se može procenjivati uticaj hroničnog stresa (feces,
19 dlaka). Potrebna su dodatna istraživanja da bi se dala preciznija procena pouzdanosti
20 određivanja kortizola i kortikosterona u pojedinim biološkim materijalima pri različitim
21 oblicima izloženosti stresogenim činiocima.
22

23 **Pregled literature** je podeljen u pet podpoglavlja. U prvom podpoglavlju kandidat
24 opisuje stanje stresa kod visoko-mlečnih krava i tok odvijanja stresne reakcije. Dodatno se
25 opisuje tok odvijanja akutne i hronične stresne reakcije kod životinja. U drugom podpoglavlju
26 kandidat nabroja glavne indikatore stresne reakcije koji se koriste u proceni izloženosti stresu.
27 Navode se i literaturni podaci vezani za druge indikatore koji mogu učestvovati u odgovoru na
28 stresnu reakciju. U trećem podpoglavlju kandidat navodi podatke o biološkim materijalima u
29 kojima se određuju koncentracije kortizola i kortikosterona. Navode se literaturni podaci
30 vezani za način dobijanja pojedinih bioloških materijala, način prelaska glukokortikosteroida u
31 različite biološke materijale kao i mogućnost upotrebe biološkog materijala za procenu
32 izloženosti stresu. Takođe, navode se i literaturni podaci za utvrđene koncentracije
33 glukokortikosteroida u pojedinim biološkim materijalima. U četvrtom podpoglavlju opisuju se
34 uzročnici stresa. Navode se podaci vezani za različite abiotičke i biotičke stresore i načini na
35 koje oni dovode do stresa kod goveda. Posebno se opisuje uticaj ekto parazita kao biotičkih
36 stresora kod goveda. U petom podpoglavlju kandidat opisuje mere zaštite životinja od
37 ekto parazita kao stresogenih činilaca. Navode se metode kojima se životinje štite od štetnog
38 uticaja ekto parazita i prednosti i mane u upotrebi pojedinih mera zaštite.
39

40 **Cilj istraživanja** ove doktorske disertacije je bio da se ispita uticaj upotrebe
41 anti ekto parazitika na sprečavanje pojave hroničnog stresa, kroz određivanje koncentracija
42 kortizola i kortikosterona u krvi, dlaci i mleku, kao i na proizvodne sposobnosti životinja, kroz
43 određivanje količine proizvedenog mleka, sastava mleka i broja somatskih ćelija u mleku. Da
44 bi se ispunio zadati cilj postavljeni su sledeći **zadaci**: (1) Uzimanje uzoraka krvi, mleka i dlake
45 od goveda rase holštajn i buša i određivanje bazalnih vrednosti kortizola (2) Izvođenje
46 postupka validacije ELISA metode sa uzorcima dlake za određivanje koncentracije kortizola i
47 kortikosterona. (3) Identifikacija prisutnih ekto parazita u objektu za smeštaj holštajn krava
48 tokom letnjeg perioda (4) Tretman odabrane grupe holštajn krava sa anti ekto parazitikom 0.,
49 28. i 56. dana ogleđa. (5) Uzimanje uzoraka krvi, mleka i dlake 0., 21., 42., 63. i 84. dana
50 ogleđa. (6) Određivanje koncentracije kortizola i kortikosterona u krvi, mleku i dlaci kao i
51 određivanje sadržaj pojedinih bio hemijskih parametara u krvi i hemijskog sastava i broja
52 somatskih ćelija u mleku iz svih uzetih uzoraka.
53

54 **Materijal i metode rada** su detaljno opisani u posebnoj poglavlju. Za ispitivanje
55 bazalnih koncentracija kortizola u krvi i dlaci krava odabrano je 13 krava, odnosno 12 junica
56 visokoproizvodne holštajn rase i 13 krava, odnosno 11 junica niskoproizvodne buša rase, dok
57 su za ispitivanje bazalnih koncentracija kortizola u mleku odabrane samo krave iz prethodnih
58 grupa. Dodatno, za utvrđivanje značaja dlake kao indikatora stresa utvrđena je razlika u
59 koncentraciji kortizola između proksimalnog i distalnog dela dlake kod svih izabranih jedinki
60 obe rase goveda. U cilju utvrđivanja razlike u koncentraciji kortizola između bele i crne dlake

1 odabrano je drugih 12 holštajn krava sa iste farme i 12 junica holštajn rase iz prethodnih
2 grupa. Pored toga izvršeno je i poređenje koncentracije kortizola u opranim i neopranim
3 uzorcima dlake kod svih ispitivanih junica, kako rase holštajn tako i rase buša.

4 Nakon određivanja bazalnih vrednosti kortizola pristupilo se izvođenju oglada koji je
5 izveden u cilju ispitivanja vrednosti indikatora stresa kod jedinki tretiranih antiektoparaziticima
6 u letnjem periodu. Krave holštajn rase izabrane za ogled podeljene su u netretiranu (n=13) i
7 tretiranu (n=13) grupu. Tretirana grupa je držana u odvojenom boksu unutar istog objekata
8 gde se nalazila i netretirana grupa. Zbog pojave mastitisa, iz netretirane grupe je isključena
9 jedna krava, dok su iz tretirane grupe isključene tri krave tako da je preostalo 12 krava u
10 netretiranoj i 10 krava u tretiranoj grupi.

11 Pre izvođenja oglada izvršena je procena zastupljenosti i identifikacija prisutnih
12 ektoprazita na životinjama. Identifikacijom ektoparazita utvrđeno je da se radilo o
13 kosmopolitski rasprostranjenoj štalskoj muvi *Stomoxys calcitrans*. Za tretman krava u
14 tretiranoj grupi upotrebljen je rastvor za polivanje po koži iz grupe piretroida, *ciflutrin*, pod
15 nazivom Bayofly Pour-on (Bayer, Berlin, Nemačka). Prvi tretman je izveden nulti dan oglada
16 prema uputstvu proizvođača polivanjem duž leđa od plečki do korena repa sa po 10 ml
17 Bayofly-a što odgovara dozi od 0,2 mg ciflutrina/kg telesne mase za goveče od 500 kg.
18 Prema uputstvu proizvođača tretman je ponovljen na isti način nakon 28 i 56 dana od prvog
19 tretmana.

20 Za određivanje bazalnih vrednosti koncentracija kortizola uzorci **krvi** su uzeti
21 punkcijom *v. jugularis* od svih životinja u jutarnjim časovima, odnosno neposredno pre muže
22 kod krava holštajn rase, a pre izlaska na otvorene pašnjake kod jedinki rase buša. Za
23 određivanje indikatora stresa u uslovima tretmana antiektoparaziticima, uzorci krvi krava
24 netretirane i tretirane grupe su uzimani 0., 21., 42., 63. i 84. dana oglada, što odgovara
25 periodima uzorkovanja P0, P1, P2, P3 i P4. Nakon toga uzorci su ostavljeni u sterilnim
26 vakutajnerima bez antikoagulansa u količini od po 10 ml ne duže od 30 minuta na sobnoj
27 temperaturi da bi se izvršila spontana koagulacija. Centrifugovanje je izvršeno na 3000
28 obrtaja/min tokom 10 minuta u cilju izdvajanja seruma. Dobijeni krvni serumi su čuvani na -20
29 °C do izvođenja analiza.

30 Za određivanje bazalnih vrednosti kortizola uzeti su uzorci **mleka** tokom jutarnje
31 muže kod krava rase holštajn, odnosno uzorci dobijeni ručnim izmuzavanjem mleka
32 neposredno nakon uzimanja uzoraka krvi od krava rase buša, zbog činjenice da se krave
33 rase buša nisu izmuzavale već je mleko korišteno isključivo za potrebe teladi koja su sisala
34 majke. Od krava rase holštajn uzorci mleka uzeti su pomoću sabirnika za dobijanje
35 reprezentativnih uzoraka mleka postavljenih na sistem za mužu *DeLaval* (Tumba, Švedska).
36 Za određivanje koncentracije indikatora stresa u mleku u uslovima tretmana
37 antiektoparaziticima, kao i za određivanje hemijskog sastava i broja somatskih ćelija u mleku
38 uzorci mleka uzeti su u istim periodima uzorkovanja kao i uzorci krvi. Uzorci mleka za
39 određivanje koncentracije hormona uzeti su u količini od po 50 ml i čuvani su na -20 °C do
40 izvođenja analiza, dok su za određivanje hemijskog sastava i broja somatskih ćelija uzorci
41 mleka uzeti u bočice sa konzervansom azidiolom i transportovani odmah do laboratorije na
42 +4 °C.

43 Uzorci **dlake** za određivanje bazalnih vrednosti kortizola uzeti su sa područja sredine
44 repa. Sa istog mesta je izvršeno i uzorkovanje dlake za određivanje indikatora stresa u
45 uslovima tretmana antiektoparaziticima u istim periodima uzorkovanja kada i uzorci krvi i
46 mleka. Uzorci dlake su uzeti pomoću električnog šišača neposredno uz površinu kože u
47 količini od po 0,5 g dlake. Bela dlaka je podeljena neposredno nakon šišanja makazama na
48 dva dela, dok crna dlaka nije deljena jer je bila znatno kraća. Uzorci dlake su čuvani u
49 plastičnim zip kesicama na -20 °C do izvođenja analiza.

50 Koncentracija kortizola određivana je u svim uzorcima krvnih i mlečnih seruma
51 pomoću radioimunološke (RIA) metode uz upotrebu komercijalnog RIA kortizol (CT) testa
52 proizvođača INEP (Zemun, Srbija). Koncentracija kortikosterona u istim uzorcima određivana
53 je pomoću imunoenzimske (ELISA) metode upotrebom komercijalnog testa za kortikosteron
54 (Demeditec, Kiel, Nemačka).

55 Koncentracija kortizola i kortikosterona u ekstraktima iz uzoraka dlake određivana je
56 pomoću komercijalnog ELISA testa za kortizol (Demeditec, Kiel, Nemačka), odnosno
57 komercijalnog ELISA testa za kortikosteron (Demeditec, Kiel, Nemačka). Apsorbance uzoraka
58 očitavane su na čitaču mikrotitar ploča Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific, Waltham,
59 SAD) na talasnoj dužini od 450 nm.

1 Upotrebljeni ELISA testovi za određivanje koncentracija kortizola i kortikosterona
2 podvrgnuti su validaciji od strane proizvođača za određivanje u serumu ili plazmi tako da je za
3 određivanje u ekstraktima dlake bilo neophodno da se uradi validacija metode, određivanjem
4 parametara validacije: senzitivnost, specifičnost, preciznost i *recovery* vrednost (određivanje
5 procenata prinosa).

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

15 Najviše 4 sata nakon uzimanja mleka, u uzorcima je određen procentualni sadržaj
16 mlečne masti (% mm), proteina (% prot), laktoze (% lakt), suve materije (% SM), suve
17 materije bez masti (% SMBM) i broj somatskih ćelija u ml mleka (BSC). Određivanje
18 hemijskog sastava mleka određeno je na principu infracrvene spektrofotometrije na aparatu
19 MilkoScan FC 6000 (FOSS, Danska). Broj somatskih ćelija određen je metodom protočne
20 citometrije na aparatu CombiFoss 6000 (FOSS, Danska).

21 Statistička obrada podataka je izvršena korišćenjem programa STATISTICA v.8
22 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, SAD). Normalnost raspodele podataka testirana je pomoću
23 Shapiro-Wilk W testa, gde rezultati za nivo značajnosti $p < 0,05$ nisu imali normalnu raspodelu.
24 Za podatke koji su imali normalnu raspodelu, vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost
25 \pm standardna greška, a za podatke koji nisu imali normalnu raspodelu vrednosti su
26 predstavljene su kao medijana, gornji kvartil i donji kvartil. Za rezultate koji nisu imali
27 normalnu raspodelu (koncentracija kortizola u krvi za određivanje bazalnih vrednosti i
28 koncentracije kortizola i kortikosterona u mleku kod oglednih grupa) podaci između grupa
29 tokom perioda uzorkovanja testirani su neparametrijskim Kruskal-Wallis ANOVA testom, uz
30 upotrebu Mann-Whitney U testa kao *post hoc* testa. Za poređenja podataka unutar grupa koji
31 nisu imali normalnu raspodelu upotrebljen je Wilcoxon match pairs test. Faktorijalna analiza
32 varijanse (eng. Factorial ANOVA) je primenjena u cilju određivanja značajnosti između grupa i
33 perioda uzorkovanja kod podataka koji su imali normalnu raspodelu. Za analizu stepena
34 značajnosti između pojedinih oglednih grupa kao *post hoc* test korišćen je *t-test*. Za poređenje
35 podataka unutar grupa, kao i proksimalnog i distalnog segmenta dlake, bele i crne dlake i
36 oprane i neoprane dlake upotrebljen je *t-test* za zavisne uzorke. Statistički značajnim su
37 smatrane p vrednosti $< 0,05$, $< 0,01$ i $< 0,001$. Koeficijenti korelacije određeni su između
38 različitih bioloških materijala kod oglednih krava za koncentracije kortizola i kortikosterona kao
39 i u istim biološkim materijalima između koncentracije kortizola i kortikosterona.

40
41 **Rezultati** su prikazani odvojeno za validaciju ELISA metode za određivanje
42 koncentracije kortizola i kortikosterona u dlaci, bazalne vrednosti kortizola u krvi, mleku i dlaci,
43 koncentracije kortizola i kortikosterona u krvi, mleku i dlaci kod oglednih krava, korelacije
44 kortizola i kortikosterona u krvi, mleku i dlaci kod oglednih krava, koncentracije biohemijskih
45 parametara krvi kod oglednih krava, mlečnost oglednih krava i hemijski sastav i broj
46 somatskih ćelija u mleku oglednih krava.

47 **Validacija ELISA metode:**

48 Senzitivnost ELISA testa za određivanje koncentracije kortizola iznosila je 25 ng/g
49 dlake i definisana je od strane proizvođača, ali je prilagođena računskim putem za
50 izražavanje u jedinicama ng/g dlake. Intraassay CV za uzorke sa relativno visokom
51 koncentracijom kortizola iznosio je 7,68%, a za uzorke sa relativno niskom koncentracijom
52 kortizola 7,49%. Interassay CV za uzorke sa relativno visokom koncentracijom kortizola
53 iznosio je 8,93%, a za uzorke sa relativno niskom koncentracijom kortizola 7,90%. *Recovery*
54 vrednost za uzorke sa relativno visokom koncentracijom kortizola iznosila je 124%, a za
55 uzorke sa relativno niskom koncentracijom kortizola 101%.

56 Senzitivnost testa za određivanje koncentracije kortikosterona u dlaci iznosila je 8,6
57 ng/g dlake i bila je niža u odnosu na vrednost propisanu od strane proizvođača, što je
58 postignuto mešanjem različitih standarda i uspostavljanjem kalibracione krive. Takođe je
59 vrednost prilagođena računskim putem za izražavanje u jedinicama ng/g dlake. Intraassay CV
60

1 za uzorke sa relativno visokom koncentracijom kortikosterona je iznosio 9,10%, a za uzorke
2 sa relativno niskom koncentracijom kortikosterona 8,42%. Interassay CV za uzorke sa
3 relativno visokom koncentracijom kortikosterona iznosio je 11,24%, a za uzorke sa relativno
4 niskom koncentracijom kortikosterona 12,60%. *Recovery* vrednost za uzorke sa relativno
5 visokom koncentracijom kortikosterona iznosila je 112%, a za uzorke sa relativno niskom
6 koncentracijom kortikosterona iznosi 90%.

7 8 **Bazalne vrednosti koncentracija kortizola u krvi, mleku i dlaci:**

9 Kod goveda rase holštajn utvrđena je statistički značajno veća koncentracija kortizola
10 u krvi u odnosu na goveda rase buša ($p < 0,01$ za krave i $p < 0,05$ za junice). Između krava i
11 junica unutar iste rase nije bilo značajne razlike.

12 Kod krava rase holštajn utvrđena je značajno veća koncentracija kortizola u mleku
13 nego kod krave rase buša ($p < 0,05$).

14 Kod krava holštajn rase utvrđena koncentracija kortizola u dlaci je bila statistički
15 značajno veća u odnosu na krave rase buša poređenjem segmenta, proksimalnog i distalnog
16 dela dlake ($p < 0,05$ za proksimalni i $p < 0,01$ za distalni segment). U dlaci junica holštajn rase,
17 koncentracija kortizola je takođe bila značajno veća u oba segmenta u odnosu na junice rase
18 buša u ista dva segmenta ($p < 0,01$ za proksimalni i $p < 0,01$ za distalni segment). Kod goveda
19 rase holštajn, nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji kortizola u dlaci između krava i
20 junica ni u jednom segmentu dlake. Kod goveda rase buša, koncentracija kortizola u dlaci kod
21 krava je bila značajno veća nego kod junica i u proksimalnom i u distalnom segmentu,
22 ($p < 0,01$, za oba segmenta). Koncentracija kortizola između proksimalnih i distalnih
23 segmenata dlake nije se razlikovala ni kod krava ni kod junica holštajn rase. Za razliku od
24 holštajn rase, kod krava i junica rase buša postojala je značajno veća koncentracija kortizola
25 u proksimalnom u odnosu na distalni segment dlake, ($p < 0,01$ kod krava i $p < 0,05$ kod junica).

26 Nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji kortizola između bele i crne dlake ni
27 kod krava ni kod junica holštajn rase.

28 Koncentracija kortizola u neopranim uzorcima dlake bila je značajno veća nego u
29 opranim uzorcima i kod junica holštajn i buša rase ($p < 0,01$).

30 31 **Koncentracije kortizola i kortikosterona u krvi, mleku i dlaci oglednih krava**

32 Nije bilo značajne razlike u koncentraciji kortizola u krvi između netretirane i tretirane
33 grupe u prva tri perioda (P0, P1 i P2) uzorkovanja. U periodima uzorkovanja P3 i P4
34 koncentracija kortizola u krvi je bila značajno veća kod netretirane u odnosu na tretiranu
35 grupu ($p < 0,01$, pojedinačno). Unutar netretirane grupe koncentracija kortizola je bila značajno
36 veća u P3 periodu u odnosu na P0 i P1 periode ($p < 0,01$, pojedinačno), a u P4 značajno veća
37 u odnosu na P0, P1 i P2 periode ($p < 0,01$, pojedinačno). U tretiranoj grupi je samo u P4
38 periodu bila značajno veća koncentracija kortizola u odnosu na P0 period ($p < 0,05$).

39 Koncentracija kortikosterona u krvi nije se značajno razlikovala između netretirane i
40 tretirane grupe u P0 periodu. U periodima P1, P2, P3 i P4 koncentracija kortikosterona u krvi
41 bila je značajno veća kod netretirane u odnosu na tretiranu grupu ($p < 0,01$ za periode P1 i P2 i
42 $p < 0,05$ za periode P3 i P4). Unutar netretirane grupe koncentracija kortikosterona u krvi je
43 bila značajno veća u periodu P2 u odnosu na period P0 ($p < 0,01$), u periodu P3 značajno
44 manja u odnosu na periode P1 i P2 ($p < 0,05$ i $p < 0,01$, redom), a u periodu P4 značajno manja
45 u odnosu na period P2 ($p < 0,01$). Unutar tretirane grupe nije bilo značajne razlike u
46 koncentraciji kortikosterona u krvi između perioda uzorkovanja.

47 Nije postojala značajna razlika u koncentraciji kortizola u mleku između netretirane i
48 tretirane grupe ni u jednom od perioda uzorkovanja. Unutar netretirane grupe utvrđeno je
49 značajno povećanje koncentracije kortizola u mleku u P3 periodu u poređenju sa P0 i P1
50 periodima ($p < 0,01$ i $p < 0,05$, redom).

51 Koncentracija kortikosterona u mleku nije se značajno razlikovala između netretirane i
52 tretirane grupe u početnom periodu uzorkovanja (P0). U svim narednim periodima
53 uzorkovanja (P1, P2, P3 i P4) koncentracija kortikosterona u mleku je bila značajno veća u
54 netretiranoj u odnosu na tretiranu grupu ($p < 0,05$ za period P1 i $p < 0,01$ za periode P2, P3 i
55 P4). Unutar netretirane grupe postojala je značajna razlika između svih perioda uzorkovanja
56 ($p < 0,01$). Unutar tretirane grupe koncentracija kortikosterona u mleku bila je značajno manja
57 u periodu P0 u poređenju sa periodima P3 i P4 ($p < 0,01$, pojedinačno), dok je u P1 periodu
58 bila značajno manja u odnosu na periode P2, P3 i P4 ($p < 0,05$ za period P2 i $p < 0,01$ za
59 periode P3 i P4).

1 Nije bilo značajne razlike u koncentraciji kortizola u proksimalnom segmentu bele
2 dlake između netretirane i tretirane grupe u P0 periodu uzorkovanja. U periodima P1 i P2
3 koncentracija kortizola u proksimalnom segmentu dlake je bila značajno manja kod tretirane u
4 odnosu na netretiranu grupu ($p < 0,05$, pojedinačno). U periodima P3 i P4 nije bilo značajne
5 razlike između netretirane i tretirane grupe, ali je koncentracije kortizola u proksimalnom
6 segmentu dlake ostala manja kod tretirane u odnosu na netretiranu grupu. Unutar netretirane
7 grupe koncentracija kortizola u proksimalnom segmentu dlake je bila značajno veća u P2
8 periodu u odnosu na P0, P3 i P4 ($p < 0,01$, pojedinačno). Takođe, unutar tretirane grupe u P2
9 periodu koncentracija kortizola u dlaci je bila značajno veća u odnosu na periode P1, P3 i P4
10 ($p < 0,01$, pojedinačno).

11 U distalnom segmentu bele dlake nije bilo značajne razlike u koncentraciji kortizola
12 između netretirane i tretirane grupe. Unutar netretirane grupe koncentracija kortizola u
13 distalnom segmentu bele dlake bila je značajno veća u P2 periodu u poređenju sa P0
14 ($p < 0,05$) i P3 i P4 ($p < 0,01$ i $p < 0,05$, redom). U tretiranoj grupi koncentracija kortizola je bila
15 značajno veća u P2 periodu u odnosu na P1 ($p < 0,05$) i P3 i P4 ($p < 0,01$, pojedinačno), dok je
16 u P0 periodu bila značajno veća u poređenju sa P3 ($p < 0,01$) i P4 ($p < 0,05$).

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

19 Koncentracija kortikosterona u proksimalnom segmentu bele dlake nije se razlikovala
20 između netretirane i tretirane grupe u prva dva perioda (P0 i P1) kao ni u periodima P3 i P4.
21 Samo u periodu P3 je bila značajno veća koncentracija kortikosterona u dlaci kod netretirane
22 u odnosu na tretiranu grupu ($p < 0,01$). Unutar netretirane grupe koncentracija kortikosterona u
23 proksimalnom segmentu bele dlake je bila značajno veća u P2 periodu u odnosu na periode
24 P0 i P1 ($p < 0,01$, pojedinačno) i P4 ($p < 0,05$), dok je u periodu P0 bila značajno manja u
25 odnosu na sve ostale periode P1 ($p < 0,05$) i P2, P3 i P4 ($p < 0,01$, pojedinačno). Unutar
26 tretirane grupe koncentracija kortikosterona u proksimalnom segmentu bele dlake u P2
27 periodu bila je značajno manja u odnosu na sve ostale periode ($p < 0,01$, pojedinačno).
28 Takođe, u P0 periodu utvrđena je značajno manja koncentracija kortikosterona nego u
29 periodima P1 ($p < 0,05$) i P4 ($p < 0,01$).

30 U distalnom segmentu bele dlake koncentracija kortikosterona bila je značajno veća
31 kod netretirane u odnosu na tretiranu grupu samo u periodu P2 ($p < 0,01$). Unutar netretirane
32 grupe koncentracija kortikosterona je bila značajno veća u P2 periodu u poređenju sa P0, P1 i
33 P3 ($p < 0,01$, pojedinačno) kao i P4 ($p < 0,05$). U tretiranoj grupi koncentracija kortikosterona je
34 bila značajno manja u P2 periodu u poređenju sa P0, P1, P3 i P4 ($p < 0,01$, pojedinačno).

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

37 Koncentracija kortizola u crnoj dlaci bila je značajno veća u P0 periodu kod grupe
38 koja će biti tretirana u poređenju sa netretiranom grupom ($p < 0,05$). U ostalim periodima nije
39 bilo značajne razlike u koncentraciji kortizola u crnoj dlaci između netretirane i tretirane grupe.
40 Unutar netretirane grupe koncentracija kortizola u crnoj dlaci je bila značajno manja u P0
41 periodu u odnosu na P1 i P2 ($p < 0,05$, pojedinačno), dok je u periodu P3 bila značajno manja
42 u odnosu na period P1 ($p < 0,01$). Unutar tretirane grupe koncentracija kortizola je bila
43 značajno manja u periodu P4 u odnosu na periode P0, P1 i P2 ($p < 0,01$, pojedinačno), dok je
44 u periodu P3 bila značajno manja u odnosu na periode P1 i P2 ($p < 0,05$, pojedinačno).

45 Koncentracija kortikosterona u crnoj dlaci bila je značajno manja samo u P3 periodu
46 kod tretirane grupe u odnosu na netretiranu ($p < 0,05$). Unutar netretirane grupe nije bilo
47 značajne razlike u koncentraciji kortikosterona u crnoj dlaci između perioda uzorkovanja, dok
48 je unutar tretirane grupe u P2 periodu bila značajno manja koncentracija kortikosterona u
49 odnosu na period P0 ($p < 0,01$).

50 Između bele i crne dlake kod netretirane grupe nije bilo značajne razlike u
51 koncentraciji kortizola u prva četiri perioda uzorkovanja (P0, P1, P2 i P3). U P4 periodu
52 koncentracija kortizola u crnoj dlaci je bila značajno veća nego u beloj dlaci ($p < 0,01$). Kod
53 tretirane grupe nije bilo značajne razlike u koncentraciji kortizola između bele i crne dlake u
54 P0 periodu. U ostalim periodima koncentracija kortizola je bila značajno manja u beloj dlaci u
55 odnosu na crnu ($p < 0,05$ za periode P1, P2 i P4 i $p < 0,01$ za P3).

56 Značajno veća koncentracija kortikosterona u crnoj u odnosu na belu dlaku bila je
57 samo u P2 periodu i kod netretirane i kod tretirane grupe ($p < 0,05$, pojedinačno).

58 Značajna pozitivna korelacija u koncentraciji kortizola između krvi i mleka utvrđena je
59 kod netretirane grupe ($R^2 = 0,347$, $p = 0,006$), kao i u zbirnim rezultatima tretirane i netretirane

1 grupe ($R^2=0,187$ $p=0,050$). Nije bilo značajne korelacije u koncentraciji kortizola između krvi i
2 dlake i mleka i dlake.

3 Značajna pozitivna korelacija u koncentraciji kortikosterona kod netretirane grupe
4 utvrđena je između krvi i dlake ($R^2=0,266$, $p=0,040$) i mleka i dlake ($R^2=0,515$, $p<0,001$). U
5 zbirnom prikazu rezultata tretirane i netretirane grupe. značajna pozitivna korelacija utvrđena
6 je između krvi i mleka ($R^2=0,326$, $p=0,001$), krvi i dlake ($R^2=0,269$, $p=0,004$) i između mleka i
7 dlake ($R^2=0,496$, $p<0,001$). Kod tretirane grupe nije bilo značajnih korelacija u koncentraciji
8 kortizola između različitih bioloških uzoraka.

9 Korelacije između koncentracija kortizola i kortikosterona bile su značajno pozitivne
10 samo u dlaci ($R^2=0,238$, $p=0,012$).

11 Koncentracija ukupnih proteina bila je značajno veća samo u P2 periodu kod tretirane
12 u odnosu na netretiranu grupu ($p<0,01$). Koncentracija albumina u P1 periodu bila je značajno
13 manja ($p<0,05$), a u P2 periodu značajno veća ($p<0,05$) kod tretirane grupe u odnosu na
14 netretiranu. U P2 periodu koncentracija globulina je bila značajno veća u tretiranoj grupi u
15 odnosu na netretiranu ($p<0,01$). Koncentracija ukupnog bilirubina bila je značajno veća u P2
16 periodu kod tretirane grupe ($p<0,05$). Aktivnost enzima alkalna fosfataza (ALP) bila je
17 značajno veća u P3 periodu kod tretirane grupe u odnosu na netretiranu ($p<0,05$).

18 Između netretirane i tretirane grupe nije bilo značajne razlike u prosečnoj mlečnosti
19 tokom perioda uzorkovanja.

20 Vrednosti parametara hemijskog sastava mleka i broja somatskih ćelija nisu se
21 značajno razlikovale između netretirane i tretirane grupe.

22
23 U poglavlju **Diskusija**, kandidat je razmotrio dobijene rezultate i uporedio ih sa
24 dostupnim podacima iz domaće i strane literature.

25 26 VI ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA (navesti zaključke koji su prikazani u doktorskoj 27 disertaciji): 28

- 29 1. Validacijom ELISA metode za određivanje koncentracije kortizola i kortikosterona
30 u dlaci utvrđeno je da se svi izmereni parametri validacije nalaze u okviru limita
31 određenih u odluci Evropske komisije iz 2002. godine (*Commission decision of 12*
32 *August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance*
33 *of analytical methods and the interpretation of results*), na osnovu čega se može
34 zaključiti da se navedena metoda sa visokom pouzdanošću može koristiti za
35 određivanje koncentracija ovih hormona u dlaci.
- 36 2. Na bazalne vrednosti koncentracija kortizola u krvi, mleku i dlaci značajnog
37 uticaja ima rasa, dok laktacija nema uticaja. U bazalnim uslovima nije utvrđena
38 značajna razlika između koncentracija kortizola u proksimalnim i distalnim
39 segmentima, kao ni između bele i crne dlake, što ukazuje da se oba segmenta
40 dlake i dlake različitih boja mogu podjednako pouzdano koristiti za procenu
41 fiziološkog stanja krava rase holštajn. Utvrđena je značajna razlika između
42 koncentracije kortizola u opranim i neopranim uzorcima dlake, što ukazuje da je
43 kortizol prisutan u znoju i loju koji oblaže spoljnu površinu dlake.
- 44 3. Krave holštajn rase držane u otvorenom sistemu su tokom letnjeg perioda
45 značajno izložene delovanju ektoparazita, odnosno kosmopolitski
46 rasprostranjenoj vrsti muva *Stomoxys calcitrans*, koja je najviše zastupljena na
47 donjem delu nogu, leđima i vratu i koja izaziva porast koncentracije indikatora
48 stresa (kortizola i kortikosterona u krvi, mleku i dlaci).
- 49 4. Tretman krava anti-ektroparazitikom pre perioda najveće infestacije muvama
50 sprečio je stresnu reakciju organizma, s obzirom da se kod tretirane grupe tokom
51 celog perioda ispitivanja koncentracija kortizola i kortikosterona u krvi zadržala na
52 bazalnim vrednostima, dok je kod netretirane grupe tokom perioda značajno
53 rasla.
- 54 5. Kod tretirane grupe koncentracija kortikosterona u mleku se tokom vremena
55 zadržala u okviru bazalnih vrednosti, dok se kod netretirane grupe značajno
56 povećavala. Kako u mleku nije zapažen uticaj tretmana na koncentraciju
57 kortizola, može se zaključiti da je koncentracija kortikosterona u mleku pouzdaniji
58 parametar za procenu izoženosti stresu u odnosu na kortizol.
- 59 6. Tretman anti-ektroparazitikom uticao je na značajno smanjenje koncentracije
60 kortizola u proksimalnom segmentu dlake, tokom vremena, dok u distalnom nije

- 1 bilo promena, tako da se može zaključiti da je za kontinuirano praćenje
2 izloženosti stresu tokom dužeg vremenskog perioda pouzdanije korišćenje
3 proksimalnog u odnosu na distalni deo dlake. Koncentracija kortikosterona nije se
4 značajno menjala kod tretirane u odnosu na netretiranu grupu, zbog čega je
5 određivanje koncentracije kortizola pouzdaniji indikator procene stresa u dlaci.
6 7. Poređenjem promene koncentracije kortizola u crnoj i beloj dlaci tokom oglada,
7 utvrđeno je da je kod tretirane grupe došlo do značajnog pada koncentracije
8 kortizola tokom vremena samo u beloj dlaci, što nije bio slučaj kod netretirane
9 grupe. Može se stoga pretpostaviti da je bela dlaka pogodnija za procenu
10 izloženosti stresu u dužem vremenskom periodu.
11 8. Utvrđena je značajna pozitivna korelacija između koncentracije kortizola u krvi i
12 mleku, kao i između koncentracija kortikosterona utvrđenih u sva tri biološka
13 materijala, ukazujući da dinamika prelaska kortizola u mleko, odnosno
14 kortikosterona u mleko i dlaku prati promenu koncentracije ovih indikatora stresa
15 u krvi. Kortizol i kortikosteron pokazuju značajnu pozitivnu korelaciju samo u
16 dlaci, ukazujući na ujednačenu dinamiku nakupljanja ova dva indikatora stresa u
17 dlaci.
18 9. Tretman antiektoparazitikom nije uticao na promenu biohemijskog sastava krvi,
19 hemijskog sastava, kvaliteta mleka, kao ni na mlečnost, iako je prosečna
20 mlečnost tokom celog perioda oglada bila numerički veća kod tretirane grupe.
21

22 **VII OCENA NAČINA PRIKAZA I TUMAČENJA REZULTATA ISTRAŽIVANJA (navesti da li**
23 **su dobijeni rezultati u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima istraživanja, kao i da li**
24 **zaključci proizilaze iz dobijenih rezultata):**
25

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

32 **VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**
33

34 **1. Da li je disertacija napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme?**
35

36 Doktorska disertacija kandidata Sretena Nedića pod naslovom „Određivanje koncentracije
37 kortizola i kortikosterona u dlaci i mleku krava kao indikatora stresa u uslovima tretmana
38 antiektoparazitocima“ je napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme.
39

40 **2. Da li disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju?**
41

42 Doktorska disertacija kandidata Sretena Nedića pod naslovom „Određivanje koncentracije
43 kortizola i kortikosterona u dlaci i mleku krava kao indikatora stresa u uslovima tretmana
44 antiektoparazitocima“ sadrži sve bitne elemente u skladu sa zahtevima za završenu doktorsku
45 disertaciju.
46

47 **3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?**
48

49 U okviru ove doktorske disertacije izvršeno je sveobuhvatno ispitivanje koncentracija kortizola
50 i kortikosterona u različitim biološkim materijalima visokoproizvodnih krava i junica i izvršeno
51 je poređenje sa vrednostima niskoproizvodnih rasa da bi se ispitao uticaj laktacije i rase na
52 bazalne vrednosti koncentracija ovih glukokortikosteroida. To daje posebnu vrednost
53 disertaciji uzimajući u obzir raznovrsnost i neusaglašenost podataka u literaturi. Izvršena je
54 validacija ELISA metode za određivanja koncentracija kortizola i kortikosterona u dlaci.
55 Ispitivanjem indikatora stresa u uslovima pojave stresne reakcije i njene prevencije detaljnije
56 je određena pouzdanost korišćenja pojedinih parametara kao indikatora stresa u govedarskoj
57 proizvodnji.
58
59
60

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

IX PREDLOG:

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

- da se doktorska disertacija prihvati a kandidatu odobri odbrana**
- da se doktorska disertacija vrati kandidatu na doradu
- da se doktorska disertacija odbije

DATUM
1.11.2017. godine

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

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

dr Tomaž Snoj, docent,
Veterinarski fakultet Univerzitet u Ljubljani

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

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

dr Željko Sladojević, naučni saradnik
JU Veterinarski institut Republike Srpske
“dr Vaso Butozan”, Banja Luka