

Univerzitet u Beogradu  
Fakultet veterinarske medicine

Milan M. Maletić

Analiza povezanosti polimorfizma gena za  
laktoferin (LTF) sa zdravljem mlečne  
žlezde i proizvodnim karakteristikama  
krava holštajn-frizijske rase

Doktorska disertacija

Beograd, 2015

University of Belgrade  
Faculty of veterinary medicine

Milan M. Maletić

Analysis of association lactoferrin (LTF) gene  
polymorphism with mammary gland health and  
production characteristics of Holstein-Friesian  
COWS

Doctoral thesis

Belgrade, 2015

Mentor:

dr Zoran Stanimirović, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine  
Univerziteta u Beogradu

dr Slobodanka Vakanjac, vanredni profesor, Fakultet veterinarske medicine  
Univerziteta u Beogradu

Članovi Komisije:

dr Zoran Stanimirović, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine  
Univerziteta u Beogradu

dr Slobodanka Vakanjac, vanredni profesor, Fakultet veterinarske medicine  
Univerziteta u Beogradu

dr Vera Katić, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine  
Univerziteta u Beogradu

dr Miloš Pavlović, vanredni profesor, Fakultet veterinarske medicine  
Univerziteta u Beogradu

dr Stanko Boboš, redovni profesor, Departman za veterinarsku medicinu  
Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

## Zahvalnica

Na kraju jedne od najvažnijih i najozbiljnih deonica u mom školovanju želeo bih da se zahvalim dragim ljudima koji su mi svojom nesputanom voljom, željom i savetima pomogli da je uspešno završim.

Zahvaljujem se kao đak i prijatelj mojim mentorima:

**-prof. dr Zoranu Stanimiroviću** na bezgraničnoj toleranciji, strpljenju, posvećenosti i vremenu koje i danas izdvaja za mene, na savetima, podršci i kad nije sve išlo kako treba. Naš zajednički rad ostaće mi u najlepšem sećanju i biti podstrek za nove zajedničke ciljeve.

**-prof. dr Slobodanki Vakanjac** na iskrenoj i velikoj podršci, zajedničkom radu, savetima i „dobrom vetru“ u leđa. Bobo, veliko hvala.

Mojim dragim profesorima, **dr Veri Katić, dr Milošu Pavloviću i dr Stanku Bobošu**, na dobronamernoj i stručnoj pomoći i savetima tokom izrade ove disertacije. Iskreno se radujem našoj budućoj saradnji.

Mom dragom šefu **prof. dr Vojislavu Pavloviću** što je verovao u mene i što je uvek bio tu kad zatreba. Šefe, hvala Vam!

Veliku zahvalnost dugujem mojim kolegama i prijateljima, **DVM Miloju Đuriću i doc. dr Vladimiru Magašu** na bezgraničnoj pomoći u prikupljanju materijala za ovu disertaciju, na iskrenom kolegijalnom i prijateljskom odnosu. Momci, srećan sam što vas imam za prijatelje!

Zahvaljujem se kolegama sa farme krava AD Napredak Stara Pazova na nesebičnoj pomoći i gostoprimstvu prilikom prikupljanja materijala za ovo istraživanje. **Posebno se zahvaljujem DVM Draganu Bursaću, dipl. ing Vasiliju Ilijaševiću, Srđanu Markoviću i Veri Matijaševiću.**

Mojoj kolegici **DVM Svetlani Nedić** na velikoj stručnoj i kolegijalnoj pomoći tokom mog rada u laboratoriji. Ceco hvala od srca!

Želeo bih da se zahvalim mojoj porodici, dragim **roditeljima Miki i Ruži i bratu Ivanu**, na ljubavi i podršci tokom mog celokupnog školovanja. Dragi moji, ponosan sam što se zovem vašim sinom i bratom! I na kraju mojoj **supruzi Jeleni** i mojim zvezdama vodiljama, ćerkama **Lenki i Mili** kojima posvećujem ovaj doktorat.

Ova doktorska disertacija predstavlja deo istraživanja u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Ev. br. 46002, pod nazivom: **“Molekularno-genetička i ekološka istraživanja u zaštiti autohtonih animalnih genetičkih resursa, očuvanja dobrobiti, zdravlja i reprodukcije gajenih životinja i proizvodnje bezbedne hrane”** pod rukovodstvom prof. dr Zorana Stanimirovića.

## SAŽETAK

Brzi razvoj molekularne genetike tokom posledenje tri decenije omogućio je direktnu analizu genoma životinja, proučavanje strukture i funkcije gena, pa samim tim pomogao boljem razumevanju delovanja nasledne osnove. Molekularno-genetičke metode omogućile su uvid u nekodirajuće delove genoma, koje kod sisara čine više od 90%. DNK (dezoksiribonukleinska kiselina) zapisa. U slučajevima gde se prate osobine koje su generalno sa niskim heritibilitetom, kao što je slučaj sa otpornošću na mastitis, MAS (marker asistirana selekcija) ili genomska selekcija pokazale su bolji rezultat u odnosu na konvencionalni metod selekcije. Primarni cilj u ispitivanju kandidat-gena povezanih sa pojavljivanjem mastitisa je identifikacija gena koji su uključeni u proces imunog odgovora mlečne žlezde. Laktoferin gen (LTF) se u većem broju istraživanja pominje kao validni molekularni marker u praćenju procesa otpornosti mlečne žlezde prema infekciji. Cilj ovog rada bio je ispitivanje polimorfizma gena za LTF i njegov uticaj na zdravstveni status mlečne žlezde i proizvodne karakteristike krava holštajn-frizijske rase u Srbiji. Ogled je obuhvatao 100 krava različite laktacione starosti (1.-4. laktacija) na farmi blizu Beograda. Životinje su bile ravnomerno raspoređene u grupama po laktacionoj starosti ( $\chi^2=0,578$ ;  $p=0,902$ ). Posle ekstrakcije DNK iz krvi amplifikovan je fragment gena za laktoferin na intronu 6 metodom PCR (*polymerase chain reaction*-reakcija lančane polimeraze). Pomoću specifičnih prajmera, identifikovana su dva genotipa AA i AB od moguća tri, (BB nije identifikovan) metodom PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*-polimorfizam u dužini restrikcionih fragmenata). U cilju ispitivanja zdravstvenog statusa mlečne žlezde, kvalitativnog sastava i ukupne proizvodnje mleka, svakog meseca kroz period standardne laktacije od 305 dana, su uzimani uzorci mleka. Broj somatskih ćelija (SCC) određivan je mikroskopski a koncentracija proteina i mlečne masti utvrđivana je spektrofotometrijski (aparatus Milkoscan). U zajedničkom uzorku od 90 krava, konstatovana je statistički vrlo značajno veća ( $\chi^2=40,894$ ;  $p<0,001$ ) zastupljenost genotipa AA ( 74 ili 82,22%) u odnosu na zastupljenost genotipa AB ( 16 ili 17,78%). Prema Hardy-Weinberg jednačini odnos genotipova AA, AB i BB se nalazi u ravnoteži ( $p=0,3547$ ). Distribucija A alela u posmatranoj populaciji bila je 91,11% a B alela 8,89%. Ovako visok broj homozigota ukazuje na smanjeni protok gena u populaciji i veći stepen genetske konzervisanosti zapata. Poizvodne karakteristike praćenih genotipova nisu se statistički razlikovale.

Količina proteina u mleku krava AA genotipa kretala se od 2,92-3,77% ( $C_v$  5,95%) a kod krava AB genotipa 3,05-3,46% ( $C_v$  3,32%). Za količinu masti odnosi su bili AA genotip 2,71-4,92% ( $C_v$  12,09%) i AB genotip 3,12-4,56% ( $C_v$  8,68%). Proizvodnja mleka je više varila, ali ne van granica statističke značajnosti. Kod krava genotipa AA interval varijacije proizvodnje mleka bio je 12,92-49,17 L ( $C_v$  23,72%), a za krave AB genotipa 16,5-40,83 L ( $C_v$  20,07%). Ovi rezultati ukazuju da polimorfizam gena za LTF nema uticaja na proizvodne karakteristike krava HF rase, što je zaključak i drugih istraživanja. Broj somatskih ćelija (SCC) je parametar koji je najviše varirao između praćenih genotipova ( $C_{vAA}=116,84\%$ ,  $C_{vAB}=89,84\%$ ). Broj SCC kod krava AA genotipa kretao se od 31200-2307000, a kod krava AB genotipa 28800-1030600. Shapiro-Wilk-ov W test je ukazao da podaci ne slede model normalne raspodele ( $p_{AA}<0,001$  i  $p_{AB}=0,027$ ), pa je i pored homogenih varijansi (za Levene-ov test  $F=0,844$ ;  $p=0,361$ ) za utvrđivanje značajnosti razlike u prosečnom broju somatskih ćelija korišćen Mann-Whitney U test. Prema U testu ( $z=0,095$ ;  $p=0,924$ ) ukupan broj somatskih ćelija ne razlikuje se statistički značajno kod krava različitih genotipova. Korelaciona analiza za praćene genotipove utvrdila je da kod genotipa AA i AB postoji negativna korelacija između SCC i mlečne masti (-0,363 i -0,341), kao i negativna korelacija između laktacione starosti i količine mlečne masti (-0,243) odnosno i proizvodnje mleka i koncentracije proteina (-0,243) kod genotipa AA. Na osnovu iznetih rezultata istraživanja različitih autora zapaža se da ne postoji konzistentnost i uniformnost u delu koji se odnosi na povezanost genotipova za LTF gen sa pojavom većeg broja somatskih ćelija u mleku. U ovom istraživanju LTF gen kao molekularni marker nije pokazao pouzdanost u procesima marker-asistirane selekcije (MAS) krava prema sklonosti ka inflamaciji mlečne žlezde.

Ključne reči: laktoferin, krave, polimorfizam, PCR-RFLP, mleko, proteini, mlečna mast, somatske ćelije, marker-asistirana selekcija

#### **Naučna oblast i uža naučna oblast:**

Veterinarska medicina, ginekologija sa andrologijom

**UDK broj: 619:618.19-002**

## SUMMARY

The rapid development of molecular genetics during last three decades has facilitate the direct analysis of the genome of animals and insight in gene structure and function, and thus helped to a better understanding basis of genetic inheritance. Molecular-genetic methods enabled access to the non-coding parts of the genome, which in mammals make up more than 90% DNA (deoxyribonucleic acid). MAS (marker assisted selection) or genomic selection showed a better result compared to the conventional method of selection when generally low heritability traits are followed, as is the case with resistance to mastitis. The primary objective in tests concerning appearance of mastitis is the identification of candidate genes that are involved in the immune response of the mammary gland. Lactoferrin gene (LTF) is proved by many studies as a valid molecular marker in monitoring the process of resistance to infection of the mammary gland. The aim of this study was to investigate the polymorphism of LTF gene and its impact on the health status of the mammary gland and production characteristics of Holstein-Friesian breed in Serbia. The experiment included 100 cows of different lactation age (1.-4. lactation) on a farm near Belgrade. Due to some health issues that are not directly related to the research 10 cows were excluded. The animals were equally distributed in groups by lactation age ( $\chi^2 = 0.578$ ;  $p = 0.902$ ). DNA was extracted from the blood and intron 6 from lactoferrin gene was amplified by PCR (polymerase chain reaction). Using specific primers, two genotypes AA and AB of the three possible (BB was not found) were identified by PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism). In order to examine the health status of the mammary gland and qualitative composition of the total milk production, each month through standard lactation period of 305 days samples were taken from the milk. Somatic cell count (SCC) was determined microscopically and the concentration of protein and fat in milk was determined by spectrophotometry (MilkoScan). The pooled sample of 90 cows showed statistically significant ( $\chi^2 = 40.894$ ;  $p < 0.001$ ) representation of the genotype AA (74 or 82.22%) compared to the prevalence of genotype AB (16 or 17.78 %). All genotypes (AA, AB and BB) were in the Hardy-Weinberg equilibrium ( $P = 0.3547$ ). Distribution of A and B alleles in the observed population were 91.11% and 8.89%, respectively. This high number of homozygotes indicates reduced gene flow in the examined population and a higher degree of genetic conservation. Production



characteristics of monitored genotypes did not differ significantly. The quantity of milk protein in cows AA genotype ranged from 2.92 to 3.77% (Cv 5.95%) and in cows AB genotype 3.05-3.46% (Cv 3.32%), while the amount of milk fat ratio were for AA genotype 2.71 to 4.92% (CV 12.09%) and 3.12 to 4.56% genotype AB (Cv 8.68%). Milk production varied within the limits of statistical significance. In cows with genotype AA interval of variation in milk production was 12.92 to 49.17 L (Cv 23.72%), while in the cows AB genotype 16.5 to 40.83 L (Cv 20.07%). These results suggest that polymorphism of genes for LTF has no effect on production performances of HF cows and this conclusion is in accordance with previous researches. Somatic cell count (SCC) present a parameter that most varied between these genotypes (CvAA = 116.84%, CvAB = 89.84%). The SCC ranged from 31200-2307000 in cows AA genotype, and 28800-1030600 in cows AB genotype. Shapiro-Wilk's W test indicated that the data do not follow a normal distribution model (PAA <0.001 and PAB = 0.027). However, despite of homogeneous variances (for Levene's test F = 0.844; p = 0.361), Mann-Whitney U test was used to determine the significance of differences in the average number of somatic cells. The total number of somatic cells does not differ significantly in cows of different genotypes according to U test (z = 0.095; p = 0.924). Correlation analysis of genotypes found negative correlation between SCC and milk fat (-0.363 and -0.341) in both AA and AB genotypes, while genotype AA showed a negative correlation between age and lactation amounts of milk fat (-0.243) and the production of milk and concentration protein (-0.243). According to previous investigation there is no consistency and uniformity in the part related to the correlation of genotypes for LTF gene with the emergence of a large number of somatic cells in milk. In this study LTF gene as a molecular marker in cows, has not proved its reliability in the process of marker-assisted selection (MAS) to tendency to inflammation of the mammary gland.

Key words: lactoferrin, cows, polymorphism, PCR-RFLP, milk, proteins, milk fat, somatic cell count, marker-assisted selection

**Scientific field and narrower scientific fields:**

Veterinary medicine, gynecology and andrology

**UDC number: 619:618.19-002**

## SADRŽAJ

|        |                                                                |    |
|--------|----------------------------------------------------------------|----|
| 1.     | UVOD                                                           | 1  |
| 2.     | PREGLED LITERATURE                                             | 3  |
| 2.1.   | Morfologija i fiziologija mlečne žlezde                        | 3  |
| 2.1.1. | Morfologija mlečne žlezde                                      | 3  |
| 2.1.2. | Fiziologija mlečne žlezde                                      | 6  |
| 2.2.   | Fiziologija imunosti mlečne žlezde                             | 8  |
| 2.3.   | Analiza genetičke varijabilnosti                               | 15 |
| 2.4.   | Kandidat geni za mastitis i polimorfizam laktoferin (LTF) gena | 18 |
| 2.5.   | Laktoferin                                                     | 20 |
| 2.5.1. | Struktura i osobine laktoferina                                | 21 |
| 2.5.2. | Izvori laktoferina u organizmu ljudi                           | 23 |
| 2.5.3. | Regulisanje sinteze laktoferina                                | 24 |
| 2.5.4. | Laktoferin kod životinja                                       | 25 |
| 3.     | CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA                                     | 31 |
| 4.     | MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA                                | 32 |
| 4.1.   | Materijal                                                      | 32 |
| 4.1.1. | Uzorkovanje mleka za ogledne analize                           | 32 |
| 4.1.2. | Uzorkovanje krvi za molekularno-genetička istraživanja         | 32 |
| 4.2.   | Metode istraživanja                                            | 33 |
| 4.2.1. | Sastav i ocena kvaliteta mleka                                 | 33 |

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2.2. Određivanje sadržaja masti i proteina u mleku                  | 33 |
| 4.2.3. Određivanje ukupne mlečnosti krava                             | 33 |
| 4.2.4. Citološka ispitivanja uzoraka mleka                            | 34 |
| 4.2.5. Brojanje ćelija                                                | 35 |
| 4.2.6. Ekstrakcija DNK iz krvi                                        | 36 |
| 4.2.7. PCR amplifikacija fragmenta laktoferin gena                    | 37 |
| 4.2.8. Polimorfizam u dužini restrikcionih fragmenata laktoferin gena | 38 |
| 4.2.8.1. Protokol za RFLP analizu                                     | 38 |
| 5. REZULTATI                                                          | 40 |
| 5.1. Distribucija genotipova                                          | 40 |
| 5.2. Rezultat odnosa krava prema genotipu i starosti                  | 53 |
| 5.3. Rezultati odnosa krava prema genotipu i laktaciji                | 54 |
| 5.4. Rezultati ispitivanja proizvodnih karakteristika                 | 55 |
| 5.5. Diskriminaciona analiza eksperimentalnih podataka                | 57 |
| 5.6. Korelacija za genotip AA                                         | 58 |
| 5.7. Korelacija za genotip AB                                         | 59 |
| 5.8. Analiza genotipova prema broju somatskih ćelija                  | 60 |
| 6. DISKUSIJA                                                          | 65 |
| 7. ZAKLJUČCI                                                          | 75 |
| 9. LITERATURA                                                         | 77 |

## 1. UVOD

Oboljenja mlečne žlezde predstavljaju jedan od najvećih problema u intenzivnoj govedarskoj proizvodnji i predmet su istraživanja mnogih naučnih radnika širom sveta. U intenzivnoj proizvodnji mleka bolest, pored zdravstvenih problema može naneti velike ekonomske gubitke. Podaci iz literature ukazuju da ovi gubici iznose preko 20% od ukupnih gubitaka, a uglavnom zavise od stepena razvoja stočarstva, odnosno mera koje se sprovode u cilju suzbijanja mastitisa. Po nekim istraživanjima na godišnjem nivou ti gubici iznose oko 200 dolara po kravi ili oko 550 litara po laktaciji. Pored ekonomskih gubitaka dolazi i do isključivanja visoko vrednih grla iz proizvodnje što automatski dovodi i do gubitaka genetskih resursa. Takođe, mleko krava obolelih od mastitisa je izvor infekcije za krajnjeg konzumenta tj. čoveka zbog visoko otpornih toksina bakterija koje mogu da prežive termičku obradu. Rezidue antibiotika koji se koriste u lokalnoj i parenteralnoj terapiji takođe mogu biti izuzetno opasni po zdravlje ljudi. Mastitisi krava javljaju se u kliničkom i subkliničkom obliku. Klinički oblik može imati perakutni, akutni i subakutni tok bolesti. Najčešća forma hroničnog toka mastitisa predstavlja subklinički mastitis. Klinički tok bolesti je ipak dosta redak i obuhvata 3-5% krava u zapatu na godišnjem nivou. Nešto veće probleme zadaje dijagnostika subkliničkih mastitisa, kod kojih se javlja poremećaj u funkciji mlečne žlezde u smislu smanjene količine lučenja i promena kvaliteta mleka. Prisustvo subkliničkog mastitisa se najsigurnije utvrđuje nalazom patogenih bakterija u uzorcima mleka kod krava koje ne pokazuju simptome bolesti.

Imajući u vidu sve navedene podatke danas se moderna stočarska proizvodnja sve više oslanja na dobijanje genetskih selektiranih grla u pogledu bolje otpornosti prema oboljenjima mlečne žlezde.

Sa tim u vezi praćena je ekspresija određenih gena povezanih sa pojavom oboljenja mlečne žlezde. Danas postoji veći broj radova u kojima je opisana njihova uloga i značaj u praćenju distribucije određenih genotipova različitih rasa krava na različitim geografskim područjima. Stepenn heritabiliteta ( $h^2$ ) za broj somatskih ćelija je mali i iznosi od 0,04 do 0,24 u zavisnosti od rase, stadijuma laktacije u kom su vršena ispitivanja. Prilikom izbora genetskog markera neophodno je praćenje određenih parametara koji ovaj marker povezuju sa osetljivošću, odnosno rezistencijom na

mastitis. Najčešće se kao parametri koriste broj somatskih ćelija u mleku, dnevni prinos mleka, sadržaj masti, proteina i laktoze. Do sada je ispitano 943 kandidat gena, odnosno povezanost njihove ekspresije sa razvojem mlečne žlezde, produkcijom mleka, osetljivošću i rezistencijom na mastitis a od toga 15 markera (Bola-13, IL8RA i TLR4, C5AR1, CD14, IFNG, IL1B, IL6, IL8, LBP, SAA3, TLR2, TLR4, TNF, LTF,  $\beta$ -4 defensin) koji mogu biti iskorišćeni u praćenju, mehanizma nastanka same infekcije i prirodne otpornosti krava na mastitis. S toga u okviru ove disertacije ispitivan je polimorfizam gena za laktoferina koji se navodi kao mogući kandidat gen u marker asistiranoj selekciji mlečnih krava i njegova pouzdanost u otkrivanju krava koje su sklonije obolenju mlečne žlezde.

## 2. PREGLED LITETATURE

### 2.1. Morfologija i fiziologija mlečne žlezde

#### 2.1.1. Morfologija mlečne žlezde

Mlečna žlezda (*glandula lactifera*, *mamma*, *uber*, *mastos*) je složena tubulo-alveolarna kožna žlezda i pripada redu žlezda holoapokrinog tipa sekrecije. Karakteristična je za klasu sisara i njena primarna uloga je sinteza mleka u ishrani novorođenčadi. (Marković, 1982)

Mlečna žlezda predstavlja jednu od sekundarnih polnih odlika ženki sisara, a kod mužjaka ostaje po pravilu celog života u rudimentisanom stanju - *mamma masculina* (lažne, ili pseudosise). Mlečna žlezda ima izgled jedinstvenog organa, i kod preživara se nalazi između zadnjih nogu u vidu kompaktnog, poluokruglog parnog organa. Vime krave čine četiri mamarna kompleksa, smeštena u ingvinalnoj regiji ventralne strane kaudalnog dela tela. Mamarni kompleks se sastoji iz žlezdanog tela - *corpus mammae* i sise - *papilla mammae*. Žlezdano telo - *corpus mammae*, se sastoji od žlezdanog epitela i intersticijalnog vezivnog tkiva sa nervima, krvnim i limfnim sudovima. Vime krave je podeljeno na dve polovine - levu i desnu, a svaka se sastoji iz dve mlečne žlezde, jedne kranijalne i jedne kaudalne, sa po jednom sisom. Podela vimena na četvrti je spolja slabo uočljiva. Funkcionalno svaka polovina vimena krave može da se podeli na prednju i zadnju četvrt, pri čemu svaka četvrt samostalno i nezavisno funkcioniše. Govori se o dvema prednjim i dvema zadnjim četvrtima, pri čemu se veoma često konstatuje da su zadnje četvrti bolje razvijene od prednjih. Prednje sise su duže od zadnjih i njihova dužina iznosi 7-9 cm, a zadnjih 5-7 cm. Kako mamarni kompleksi međusobno ne komuniciraju, zapaljenski proces na jednom kompleksu ne može da se prenese na drugi.

Spolja, vime je prekriveno finom, mekom i elastičnom kožom, koja je prekrivena retkom dlakom. Od spoljašnjih uticaja, vime je zaštićeno kožom, koja na spoljašnjem otvoru sisnog kanala prelazi u sluzokožu. Na sisama, koža je grublja nego

na vimenu i srasla je sa podlogom. Osnovna uloga kože je da pokriva vime i da štiti unutrašnjost mlečne žlezde. Vime je za ventralni deo trbušnog zida fiksirano pomoću kože, površne i duboke fascije i *ligamentum suspensorium*, a fibro-elastično tkivo levog i desnog suspenzornog ligamenta onemogućava istezanje, kada je žlezda ispunjena mlekom. Suspenzorni sistem vimena - *apparatus suspensorius mammarius* je baziran na dobroj povezanosti žlezde za telo jedinke i čine ga dve grupe ligamenata - medijalni i lateralni suspenzorni ligament. Medijalni suspenzorni ligament je najvažniji deo suspenzornog sistema kod goveda. Izgrađen je od elastičnog i fibroznog vezivnog tkiva, ima sposobnost da se istegne kada se žlezda puni mlekom, omogućavajući tako promene u veličini i masi mlečne žlezde. Ova struktura delimično odvaja levu od desne polovine vimena. Oštećenje ovog ligamenta dovodi do istezanja vimena i veće predispozicije za nastanak povreda, posebno sisa. Lateralni suspenzorni ligament sadrži više kolagena nego elastina i oblaže vime sa spoljašnje strane. Osim kože, vime je obavijeno i dvema fascijama - površnom i dubokom, odnosno tankom vezivno-tkivnom kaspulom.

Ispod fascije je kapsula, koja se sastoji iz vezivnog tkiva, koje sadrži elastična vlakna i dosta masnog tkiva. Vezivnotkivna kapsula se sastoji od intersticijuma - međuprostornog tkiva i parenhima - žlezdanog tkiva. Od kapsule u parenhim vimena idu vezivnotkivni nastavci i dele ga na režnjeve - *lobuse* i režnjiće - *lobule*, koji čine osnovu mlečne žlezde. Ti nastavci predstavljaju intersticijum vimena, koji je iste građe kao i kapsula. U intersticijumu leže krvni sudovi, nervi i odvodni kanali mlečne žlezde - *ductus lactiferi*. Između intersticijuma se nalazi parenhim vimena. Najjače je razvijen u odnosu na druge strukturne delove vimena u punom stadijumu laktacije i sastoji se iz sitnih razgranatih kanalića, koji se šire u sekretorne meškove - alveole, koje se sastoje od jednog sloja epitelnih ćelija, koje leže na bazalnoj membrani. Debljina unutrašnjeg sloja sekretornih epitelnih ćelija može varirati od relativno visokih 8  $\mu\text{m}$  kod delimično ispražnjenog vimena, do svega 3  $\mu\text{m}$  kod vimena punog mleka (Gvozdić 2010). Između epitelnih ćelija i bazalne membrane su mioepitelne ćelije, specijalizovane mišićne ćelije koje se pod dejstvom oksitocina, koji se sintetiše u neurosekretornim ćelijama hipotalamusa i deponuje u neurohipofizi, kontrahuju i posledično dovode do pojačanog lučenja mleka iz alveola (Adams, 1986).

Epitel mlečnih alveola je niskoprizmatičan u acinusima koji su relativno neaktivni, a u toku aktivnosti, odnosno sinteze mleka, je visokoprizmatičan, a apikalna površina citoplazme štrči u lumen alveola. U toku aktivne sekrecije, deo membrane sa jednim delom citoplazme sa apikalnog dela ćelije otpadne u lumen alveola (holoapokrini tip sekrecije). Alveole su opkoljene bogatom mrežom krvnih i limfnih kapilara. Imaju posebnu *membrana propria*, obloženu ćelijama. Mleko se stvara u epitelnim ćelijama alveola, zbog čega se ove ćelije zovu mlečnim ćelijama i predstavljaju osnovne sekretorne jedinice mlečne žlezde. Meškovi imaju odvodne kanaliće - *ductuli lactiferi*, koji su položeni intralobularno. Ovi kanalići se međusobno udružuju i formiraju veće kanale - *ductus lactiferi*, koji su položeni interlobularno. *Ductus lactiferi* se ulivaju u mlečnu cisternu - *sinus lactiferi*. Iz cisterne izlazi sisni kanal koji vodi mleko kroz sisu - *ductus papillaris*. On se završava malim otvorom na vrhu sise - *ostia papillaria*, kroz koje prilikom muže ili sisanja, mleko dospeva u spoljašnju sredinu. (Šijački i sar. 1997)

Sise krave - *papilla mammae* su valjkaste i na njima nema dlaka, lojnih i znojnih žlezda. Veličina i oblik zavise od oblika i veličine vimena i proizvodnje mleka. Prednje su uglavnom duže od zadnjih. Imaju po jedan izvodni kanal - *ductus papillaris*, sa jednim otvorom - *ostium papillae*. Najpoželjnije su cilindrične sise, sa tupim i zaobljenim završetkom, jer omogućavaju pravilno i ravnomerno isticanje mleka iz vimena.

Kružni mišić - *m. sphincter* zatvara sisni kanal i na taj način se sprečava da mleko spontano curi iz napunjene cisterne ili između dve muže, a ima i ulogu barijere tj. sprečava prodor bakterija u unutrašnjost vimena. Deo cisterne se nalazi i u sisi i zato se cisterna krave deli na žlezdani i sisni deo. Žlezdani je širi, a sisni uži.

Sisna cisterna (cisterna papile) - *sinus lactiferi seu papillaris* predstavlja nastavak žlezdane cisterne (cisterne vimena) - *sinus lactiferi seu glandularis*. U žlezdani deo cisterne se uliva 8 do 12 kanala žlezda, a funkcija cisterni je da deponuju mleko. Prelaz žlezdanog u sisni deo je označen prstenastim naborom sluzokože – Fürstenbergova rozeta -mišićni sloj u unutrašnjosti sisnog kanala, čija je fiziološka uloga da u potpunosti zatvori sisni kanal između dve muže (Marković, 1982). U zidu ovog kanala je kružni sistem mišićnih ćelija i elastičnih vlakana - *musculus sphincter*



*papillae*, koji za vreme muže i sisanja omogućava da mleko prolazi u mlazevima kroz sisni kanal u spoljašnju sredinu (Šijački, 1997).

Vime je dobro snabdeveno krvlju. Krv dovodi *a. pudenda externa* koja ulazi duboko u vime i daje ogranke za bazalne delove vimena (*a. basalis cranialis et caudalis*) i limfne čvorove, ovi ogranci idu po osnovi vimena. Posle ulaska u parenhim vimena, *a. pudenda externa* deli se na dva ogranka: *arteria mammaria caudalis* i *arteria mammaria cranialis*. Najzad sve sinusne arterije se skupljaju oko proksimalnog dela svake cisterne stvarajući obruč iz kojeg idu ogranci za sise, a to su *arteria papilaris cranialis et caudalis*. Venski sistem je mnogo jače razvijen nego arterijski. Pored vena, koje odgovaraju arterijama, znatan deo krvi odlazi putem *vena subcutaneae abdominis*.

Regionalni limfni čvorovi krave mogu se podeliti na površinske i duboke. Svi se oni ulivaju u *supramammarne limfne čvorove* i mogu se palpirati na bazi zadnjih četvrti vimena.

Mlečna žlezda je inervisana granama *nervus spermaticus externus ili inguinalis*, a u njoj se nalaze i vlakna *nervus simpaticusa* (Šijački 1997, Marković 1982).

### **2.1.2. Fiziologija mlečne žlezde**

Mlečna žlezda mladih životinja do puberteta pokazuje neznatnu aktivnost. Sa polnom zrelošću razvija se mlečna žlezda pod uticajem hormona ovarijalnog ciklusa estrogena i progesterona, što dovodi do strukturnih promena u smislu izdužavanja i rasprostiranja primarnih mlečnih kanala (Cowie 1980). Začeci formiranja mlečnih žlezda uočavaju se već u embrionalnom periodu u vidu pupoljka pokožice u vezivu (krznu). Jedan deo pupoljka ostaje povezan sa pokožicom, a onaj dublje u vezivu se može granati u više grana. Ove grane postepeno formiraju šupljine i pretvaraju se u kanaliće sa dvoslojnim niskoprizmatičnim epitelom. Od dela povezanog sa površinom pokožice formira se mali začetak bradavice - sise. Od svakog mamarnog pupoljka razvije se posebna žlezdana struktura. Oko sedme nedelje graviditeta fetus je dugačak 9 cm i jasno se uočavaju četiri mamarna pupoljka, koji odeđuju mesto formiranja budućih

četvrti vimena. Ponekad se mogu javiti dodatni mamarni pupoljci od kojih nastaju prekobrojne sise. Deobom epidermalnih ćelija ispod mamarnog pupoljka nastaje osnova primordijalnog sisnog kanala i sinusa. Kada embrion dostigne veličinu od 19 cm, primordijalna osnova sisnog kanala nešto je duža od sise i na njenom unutrašnjem kraju se pojavljuje šupljina, koja se širi u proksimalnom smeru. Ovo proširenje se postepeno sužava kada dosegne sloj epidermalnih ćelija na vrhu sise, dajući tako začetak budućeg sisnog kanala (Hibbitt, 2004). Kada fetus dostigne dužinu od 35 cm, diferencirano je više regiona buduće mlečne žlezde: ovalni prostor u proksimalnom delu ispunjen tečnošću, što predstavlja začetak budućeg sinusa mlečne žlezde, zatim nešto izduženi središnji deo, od kojeg nastaje sisni sinus, i uski sisni kanal, koji je još uvek prema spolja zatvoren keratinizovanim epitelnim ćelijama (Hibbitt, 2004). Dalje formiranje mlečne žlezde nastavlja se tako što se od epitela gornje površine mlečnog sinusa stvaraju sekundarni izdanci, koji se šire u dorzalnom pravcu, prorastajući sloj ćelija masnog tkiva. Kada se unutar sekundarnih izdanaka formiraju kanali, nastaje osnova za 10 i više glavnih mlečnih kanala. Iz mezenhima, koji se nalazi oko rudimentiranih žlezdanih kanalića, diferenciraju se krvni i limfni sudovi, manja količina glatko-mišićnog tkiva i fibro-elastična stroma, sa posebno razvijenim delovima, gde se formiraju suspenzorni ligamenti (Hibbitt, 2004). U graviditetu počinje buran razvoj mlečne žlezde u organ za laktaciju. Kod goveda već u četvrtom mesecu graviditeta počinje razvoj alveolarnog sistema. Razvoj kanalikularnog sistema zavisi od estrogena, a za razvoj parenhima potreban je progesteron. U evoluciji mlečne žlezde, primarna i vodeća uloga ipak pripada hipofizi, jer njeno otklanjanje oduzima i estrogenu i progesteronu svaku stimulativnu akciju. Prema za sada poznatim činjenicama prolaktin ima najjači mamogeni efekat koji je potpomognut delovanjem somatotropina hormona rasta koji je samostalno neaktivan (Stojić 1999)

Najjači “mehanički efekat” na mlečnu žlezdu ima oksitocin, koji izaziva kontrakcije mioepitela oko mlečnih kanalića i dovodi do spuštanja mleka. Preduslov za aktivniju ejakciju mleka su pretežno opšte mehaničke i termičke draži papila ili sise. Nadražaj za aktivnu ejakciju mleka javlja se aktom sisanja ili muže, i on se dalje prenosi preko srednjeg *lemiskus-a* i *nucleus supraopticus* u hipotalamusu, a zatim do hipofize. U neurohipofizi se izlučuje oksitocin, koji se stvara u nukleusima međumozga, a

akumuliran je u zadnjem režnju hipofize. Delovanje oksitocina traje vrlo kratko, od 6 do 8 minuta (Marković, 1982).

## 2.2. Fiziologija imunosti mlečne žlezde

U poslednje vreme velika važnost se pridaje prirodnim odbrambenim sposobnostima mlečne žlezde. U nespecifične odbrambene mehanizme mogu se svrstati prirodna barijera, koju čine anatomske pravilno razvijeno vime i sisa, epitel sisnog kanala, Fürstenbergova rozeta, kao i faktori rezistencije čitavog organizma (kondicija, konstitucija). Ovi nespecifični faktori mogu se nazvati "prvom linijom" odbrane mlečne žlezde od mikroorganizama. Kada mikroorganizmi prođu ovu liniju odbrane i prodru u cisternu sreću se sa "drugom linijom" odbrane mlečne žlezde, koju sačinjavaju somatske ćelije u mleku, lizozim, **laktoferin**, komplement - nazvani jednim imenom laktenini i imunoglobulini koji su odgovorni za specifičan imunološki odgovor. Prirodni odbrambeni sistem u mlečnoj žlezdi se bazira na četiri mehanizma (Leitner, 2000; Stojić, 2001):

1. fizička zaštita, koju čini intaktna koža vimena;
2. fizičko-hemijska zaštita, koju čini keratin sa svojim baktericidnim dejstvom;
3. nespecifični imunološki odgovor sa aktivacijom zapaljenske reakcije i
4. specifični imunološki odgovor koji uključuje aktivaciju imunocita.

Jedan od faktora koji doprinosi sniženju rizika od bakterijske infekcije vimena je svakako zdrava i neoštećena koža vimena, a posebno na papilama – sisama. *Stratum corneum* zdrave kože vimena je barijera za prodor vode sa površine prema unutra, kao i za gubitak tečnosti iz tkiva. Utvrđeno je da ako procenat vode u orožalom epitelu opadne ispod 10% dolazi do njegovog pucanja (Blank i sar., 1953) i tada može da dođe do gubljenja zaštitnih kiselih materija kože, među koje spadaju mlečna kiselina, slobodne masne kiseline i aminokiseline (Raab, 1990). Ove promene u epitelu kože pogoduju razmnožavanju patogenih bakterija (*Staphylococcus aureus*) na papilama, a time i mogućnost nastanka intramamarnе infekcije (Pankey i sar., 1984).

Smatra se da anatomske pravilno razvijeno vime i sise smanjuju mogućnost pojave mastitisa. Pod tim se podrazumeva pravilan oblik vimena, kao i veličina sise i

sisnog kanala. Nije poželjno da se u eksploataciju uključuju životinje sa pasisama ili nepravilnim oblikom sisa i sisnog kanala, jer to povećava rizik od nastanka mastitisa. Sisni kanal je prosečno dugačak oko 10 mm (3-18 mm), a prečnik mu iznosi 2 mm (Hamann, 2000). U zidu sisnog kanala nalazi se sfinkter od glatko-mišićnog tkiva, koji u periodu između dve muže zatvara sisni otvor. U membrani mišićnih ćelija koje grade sfinkter se nalaze brojni adrenergični receptori ( $\alpha$  i  $\beta$  receptori), a neprekidna stimulacija preko simpatikusnog dela autonomnog nervnog sistema održava sfinkter u tonusu duže vreme. Za otvaranje sisnog kanala potreban je stimulus u vidu sisanja ili muže i tada on ostaje otvoren čak i 20-30 minuta nakon muže. Krave koje se lakše muzu imaju manju zastupljenost  $\beta_2$  receptora u odnosu na  $\alpha_2$  receptore (Vandeputte, 1982). Ustanovljen je veći procenat infekcija kod životinja sa većom prohodnošću kanala. Redovnom mužom, tj. efektom ispiranja se može smanjiti broj mikroorganizama koji su naselili sisni kanal.

Sisni kanal je iznutra obložen višeslojnim epitelom (*stratum granulosum*, *stratum corneum*) koji je relativno deblji u odnosu na ostale delove kože goveda. *Stratum corneum* odgovara sloju keratina koji zatvara lumen kanala između dve muže. Količina keratina u sisnom kanalu kreće se u proseku oko 7 mg (2-14 mg) (Hamann, 1987). Keratin ima zaštitnu ulogu tako što predstavlja mehaničku barijeru u sisnom kanalu, posebno tokom kasnih faza perioda zasušenja. Osim toga zaštitna uloga keratina je da se na njemu absorbiraju bakterije koje se deskskvamacijom orožalih epitelnih ćelija sisnog kanala izbacuju u spoljnu sredinu. Keratin u sisnom kanalu je bogat esterifikovanim i neesterifikovanim masnim kiselinama, a posebno palmito-oleinskom i linoleinskom kiselinom, koje imaju snažan antimikrobni efekat. Keratin predstavlja mehaničku barijeru u sisnom kanalu, posebno u periodu zasušenja. Genetski uticaj na sadržaj masnih kiselina u keratinu je visok i može se koristiti za selekciju krava više otpornih na mastitis. Iz keratina su izolovani katjonski proteini, kao što je ubikvitin, koji inhibira rast *Streptococcus agalactiae* i *Staphylococcus aureus*. Smatra se da se ovaj protein, koji je pozitivno naelektrisan, vezuje za negativno naelektrisan zid mikroorganizama i dovodi do poremećaja u osmotskoj regulaciji sa pojavom prodora tečnosti i citolize (Nickerson, 1985).

Mleko sadrži supstance koje inhibitorno deluju na adherenciju i razmnožavanje bakterija, poznati pod nazivom laktenini. Naziv laktenini odnosi se na komplement, lizozim, laktoferin i laktoperoksidazu (Tizard, 1996). U mleku zdravih četvrti nalazi se veoma mala količina komponenti sistema komplementa, ali se može aktivirati alternativnim putem (Rainard 1995). Budući da aktivacija alternativnim putem ne zahteva prisustvo antitela to omogućava direktni nespecifični mehanizam odbrane koji je aktiviran pre bilo kakvog oblika senzibilizacije (Tizard 1996). Komplement je sistem koji se sastoji od proteinskih komponenti (C1-C9) i zajedno sa antitelima predstavlja element humoralnog imunološkog sistema (Rainard i sar., 1995). Predstavlja nespecifičan faktor imunološke odbrane i njegova aktivnost je usmerena na biološke membrane, što ima za krajnji cilj njihovo oštećenje (Mihajlović, 1983). Pored toga, aktivisanje komponenti komplementa pobuđuje neke vrste ćelija (mastocyte) da izlučuju biološki aktivne supstance (histamine), a hemotaksičnim uticajem privlače fagocite, omogućavaju opsonizaciju i deluju flogistično. Komponenta C5a sistema komplementa je stimulator aktivnosti polimorfonukleara i deluje kao faktor pozitivne hemotaksije, privlačeći neutrofile na mesto prodora bakterija (Schuster i sar., 1997).

Jedan od stalnih sastojaka mleka je lizozim. Lizozim nalazi u telesnim tečnostima, kao što je pljuvačka, na površini sluzokože nosne šupljine i digestivnog trakta, kao i u mleku. Lizozim je bazni protein opisan još od strane Fleminga 1922. godine, a svoje baktericidno dejstvo ispoljava tako što cepa veze između N-acetil glukozamina i N-acetil muraminske kiseline u kompleksu mukoproteina ćelijskog zida bakterija (Tizard, 1996). Koncentracija lizozima u mleku je niska (0,13 mg/100ml) ali se ona povećava za vreme infekcije. Više autora navodi da krave sa niskom koncentracijom lizozima u mleku oboljevaju u većem procentu od mastitisa, što ukazuje da količina i nivo ovog proteina u mleku može biti pokazatelj predispozicije te jedinke za pojavu mastitisa (Nickerson, 1985). Gram pozitivne bakterije su uopšte osetljivije na lizozim, zato što imaju mnogo jednostavniji ćelijski zid, koji sadrži više od 90% peptidoglikana. Neke bakterije, kao što su stafilokoke, sadrže teihonsku kiselinu i druge komponente, koje vezuju lizozim i sprečavaju difuziju do njegovog supstrata. (Bojanić, 2000).

U mleku se pored laktoferina nalazi i transferin, protein koji takođe za sebe vezuje gvožđe. Za razliku od mleka glodara i kunića, u mleku krava je koncentracija transferina veoma niska (1mg/ml u kolostrumu, 0,02-0,04 mg/ml u mleku, 4-5 mg/ml u krvnom serumu) (Sanchez, 1988). Transferin se ne sintetiše u vimenu krava, već prelazi u mleko iz krvi putem transcitoze. U toku mastitisa, njegova koncentracija u mleku se povećava, prateći porast albumina i dostiže 1 mg/ml kod mastitisa izazvanog sa *E. coli* (Reinard, 1983).

Mleko sadrži visoku koncentraciju laktoperoksidaze i jona tiocijanata ( $\text{SCN}^-$ ). U prisustvu egzogenog vodonik-peroksida, laktoperoksidaza može da oksiduje  $\text{SCN}^-$  do bakteriostatskih proizvoda, kao što je oksid jona tiocijanata ( $\text{OSCN}^-$ ). Tiocijanat se nalazi u mleku, posebno kod krava koje sa hranom unose dosta leguminoza, dok se vodonik-peroksid može dobiti kako od neutrofilnih granulocita, tako i od samih mikroorganizama (streptokoke). Laktoperoksidaza se nalazi i u epitelu mlečne žlezde, u koncentraciji od 2-35 mg/ml, a tiocijanat potiče iz zelenih hraniva koje sadrže prekusore tiocijanata (1-10 ppm) (Nickerson, 1985).

Enzim ksantin oksidaza iz omotača masne kapljice katalizuje stvaranje azot oksida od neorganskog nitrita, koji u aerobnim uslovima dovodi do nastanka peroksinitrita sa snažnim baktetricidnim dejstvom. Mleko krava koje ima visoku aktivnost ksantin oksidaze, deluje bakteriostatski na *E. coli*, nakon dodavanje nitrita (Hancock, 2002).

U mleku krava, u fiziološkim uslovima, se stalno nalaze različiti tipovi ćelija: neutrofilni granulociti (polimorfonuklearni granulociti, PMNL), limfociti, eozinofili, makrofagi i epitelne ćelije (Pillai, 2001). Ovaj ćelijski sadržaj je poznat pod nazivom **"somatske ćelije u mleku"** (*milk somatic cells*, SCC). U mleku krava iz zdravih četvrti vimena najbrojnije ćelije su makrofagi i njihov procenat se može kretati između 30-74% od ukupnih ćelija u mleku zdravog vimena (Burvenich 2000). Prema mišljenju Wiltona (1972) rizik od pojave kliničkih mastitisa je veći u zapaćima krava sa povećanim brojem somatskih ćelija. Nasuprot tome sve više postaje jasno da je veoma nizak broj SCC praćen povećanim rizikom od kliničkog mastitisa. Broj somatskih ćelija može da predstavlja pokazatelj subkliničkih mastitisa i kao takav može da posluži u programu selekcije. Uzgoj grla sa nižim brojem SCC treba da rezultira smanjenjem broja kliničkih

mastitisa, jer su SCC i klinički mastitisi u pozitivnoj korelaciji ( $r=0.6-0.80$ ) (Mrode 1996). Broj SCC u mleku zdravih krava kreće se od  $160-450 \times 10^3/\text{ml}$ , a prema kriterijumima međunarodne mlekarske federacije, granična vrednost broja ćelija u 1 ml mleka zdravih krava iznosi  $500 \times 10^3/\text{ml}$  (Schalm, 1971). Na početku laktacije, broj somatskih ćelija može da se kreće i do 2.500.000 ćelija u ml (Frerking, 1961). Diferencijalna bela krvna slika u mleku zdravih četvrti pokazuje najveći procenat polimorfonukleara ( $23, \pm 9,8\%$ ), zatim makrofaga ( $10,1 \pm 7,4\%$ ), i limfocita ( $23,9 \pm 17,4\%$ ) od čega je procenat pomagačkih T limfocita  $5 \pm 4,2\%$  (Th limfociti  $\text{CD4}^+$ ) i citotoksičnih T limfocita  $11,7 \pm 6,8$ , (Tc limfociti,  $\text{CD8}^+$ ) (Chaffer 2000). Pillai (2001) u svojim istraživanjima navodi da su u mleku zdravih krava dominantni ćelijski tip makrofagi, dok su neutrofili dominantni ćelijski tip u toku infekcije. U uzorcima mleka uzetim neposredno pre muže procenat polimorfonukleara je sličan kao u uzorku ukupnog mleka (40-50%), dok u uzorku uzetom posle muže procenat opada na svega 8% (O'Brien, 1999). Broj ćelija u mleku široko varira i zavisi od faze laktacije. Kako laktacija odmiče, povećava se ukupan broj i udeo neutrofila, a blizu zasušenju može da dostigne i 40% (Concha, 1986). Prestankom izmuzanja, tkivo mlečne žlezde podleže intenzivnim fiziološkim promenama. U početku zasušenja, naročito u prvih sedam dana, broj ćelija poraste tako da dostigne oko  $2-5 \times 10^6/\text{ml}$ , a posle toga opada i zadržava se na  $1-3 \times 10^6/\text{ml}$  (Mc Donald i Anderson, 1981). U toku procesa involucije broj somatskih ćelija se povećava i do 1.000.000 ćelija/ml, verovatno kao posledica prestanka muže, da bi se pred sam partus broj ćelija ponovo smanjio na normalne vrednosti (Schalm, 1971, Nickerson, 1985). Početno povećanje broja somatskih ćelija u periodu zasušenja je verovatno posledica prestanka izmuzanja mleka kao i resorpcije komponenti mleka. Ukupan broj ćelija ostaje na visokom nivou kroz najveći period zasušenja. U toku zasušenja, najčešći tip ćelija u mleku su makrofagi, dok kolostrum pokazuje porast polimorfonuklearnih leukocita (PMNL), kao i kod svih infekcija mlečne žlezde. U sekretu neinficirane mlečne žlezde tokom zasušenja je povećan broj makrofaga (48%) i limfocita (30%), dok je broj polimorfonukleara smanjen (22%). Broj B limfocita se povećava u sekretu mlečne žlezde u zasušenju (28%), a posebno je visok u kolostrumu (40%) što objašnjava povećanu koncentraciju IgA u kolostrumu (Nickerson 1985). Aktivnost leukocita kako iz krvi tako i iz mleka je snižena nedeljama pre porođaja, a posebno u vreme telenja, a vraća se na fiziološki nivo 1-3 nedelje posle

partusa. smanjena baktericidna aktivnost leukocita iz krvi značajno smanjuje njihovu sposobnost za eliminisanje mikroorganizama iz mlečne žlezde (Saad 1989). U većini uzoraka mleka mogu se naći ćelije sekretornog epitela vimena (Lee, 1980). U mleku se mogu naći najčešće tri različite kategorije ćelija. Polimorfonuklearni leukociti - neutrofilni granulociti su najčešće ćelije koje se mogu naći u mleku, sa jedrima od 2 do 5 segmenata. Veličina im varira od 9 do 15  $\mu\text{m}$ . Mleko najviše sadrži neutrofilnih granulocita, a zatim eozinofilnih i najmanje bazofilnih granulocita (Miljković, 1992). Monociti bez lipidnih inkluzija se karakterišu promenljivim i nejasnim oblikom nukleusa sa difuznim hromatinom. Citoplazma ovih ćelija može biti i nekoliko puta veća od jedra, a veličina im se kreće od 8 do 18  $\mu\text{m}$ . Monocita sa lipidnim inkluzijama ima dve vrste. Jedna vrsta ćelija su tipične masne ćelije mleka sa karakterističnom membranom oko fagocitnih vakuola. Druga vrsta ćelija je slična prvoj, samo bez karakteristične membrane i manje je prisutna u mleku od prve vrste ćelija. Limfociti su karakteristični po krupnom jedru i sa veoma malo prisutne citoplazme.

Epitelne ćelije potiču iz alveola, mlečnih kanala, cisterne i izvodnog kanala mlečne žlezde. Veoma često se mogu naći tesno priljubljene jedna uz drugu ili u skupini. Jedro je tamno obojeno i može biti različitog oblika i veličine, što zavisi iz kog dela kanala potiču (Lee, 1980). Ove ćelije spadaju u najkrupnije ćelije mleka i njihova veličina iznosi 55  $\mu\text{m}$ . Vrsta i broj ćelija u mleku se menjaju u zavisnosti od fiziološkog stanja organizma (Katić, 2007). Promene u sastavu i količini mleka su jasno izražene pri broju ćelija većem od 500.000/ml. Dalja analiza pojedinih sastojaka pokazuje korelaciju između intenziteta subkliničkog mastitisa i smanjenja sadržaja masti, suve materije bez masti, kapa kazeina, alfa s-kazeina, vitamina B<sub>2</sub> i C, a povećanja koncentracije bovinih serum albumina, beta laktoglobulina, alfa laktalbumina, katalaze, kisele fosfataze, aril esteraze, sadržaja hlorida i natrijuma, povećane aktivnosti plazmina i pri tome se povećavaju pH i električna provodljivost u mleku. Ove promene dovode do smanjenja termostabilnosti mleka, produženja vremena koagulacije mleka i smanjenja održivosti mleka (Katić, 2007, Santos i sar., 2003, Vangroenweghe i sar., 2002). Povećan broj SCC je povezan sa smanjenjem proizvodnje mleka i promenama koje mogu dovesti do produženja vremena podsiravanja, zadržavanje veće količine u siru, inhibiranja rasta starter kultura, itd (Auldist i Hubble 1998). Povećan broj SCC je takođe povezan i smanjenjem koncentracije laktoze, dok pojedini autori navode da dolazi do neznatnih



promena u koncentraciji masti u odnosu na mleko sa dozvoljenim brojem SCC (Korhonen i Kaartinen, 1995).

Citokini su supstance proteinske prirode koje imaju ulogu sličnu hormonima, regulišu lokalnu zapaljensku reakciju, a putem cirkulacije mogu dospeti do udaljenih organa i izazvati sistemsku reakciju. U kaskadnoj reakciji odgovora akutne faze, citokini se luče od strane stimulirajućih makrofaga, a to su: interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ), interleukin (IL-1), IL-6, IL-8, tumor nekroza factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) i ostali faktori nespecifičnog imunološkog odgovora (Burvenich i sar., 2000). Takođe se oslobađaju metaboliti arahidonske kiseline (prostaglandini i leukotrieni), histamin i serotonin, komponente sistema komplementa (C3a i C5a, anafilatoksini) i baktericidni slobodni kiseonikovi radikali (Burvenich i sar., 2000).

Limfociti u mleku i tkivu mlečne žlezde su druga linija odbrane vimena od infekcije. Osnovu za specifični imunski odgovor čine limfociti koji se mogu naći u mleku krava u svim fazama laktacije i čine 1-2% ukupne populacije ćelija. Limfociti prepoznaju antigene preko membranskih receptora koji definišu specifičnost, raznolikost i memorijske karakteristike imunskog sistema, stoga ove ćelije imaju značajnu ulogu u održavanju integriteta mlečne žlezde (Mehrzađ i Zhao, 2008), kao i u odbrani od uzročnika (Sordillo, 2002). Ispitivanja broja B-limfocita pokazuje da on varira od 2 do 20% od ukupnog broja ćelija u mleku, dok procenat monocita u mleku se kreće od 20% do čak 60% (Park i sar., 1992). Nosioći humoralne imunološke reakcije su B-limfociti. Imunološki zreli B-limfociti sintetišu se u hematopoetičnim ogranima, poseduju receptore koji su po prirodi imunoglobulini, i oni se nalaze u membrani. Najpre se pojavljuju B-limfociti sa receptorima koji nose IgM, zatim IgG i na kraju B-limfociti sa receptorima IgA (Mihajlović 1983). Prema funkciji T-limfocita može se razlikovati nekoliko subpopulacija, koje se dele na efektorske i regulatorske. Najzastupljeniji u populaciji T-limfocita su citotoksični CD8<sup>+</sup>. Odnos CD8 i CD4 ne prelazi 1% (Park i sar., 1992). Najveći deo efektorskih ćelija specifične odbrane organizma u epitelu mlečne žlezde su T-limfociti. Oni nose na sebi posebnu vrstu TCR markera koji su  $\gamma\delta$  konfiguracije, a ekspresija posebnog gena (V $\gamma$ 7) ukazuje da bi ovi intraepitelni limfociti mogli da budu nezavisni od timusa. Ispitivanja pokazuju da postoje značajne individualne razlike u broju polimoronukleara, makrofaga i CD4<sup>+</sup> T limfocita u mleku zdravih krava (Leitner i sa. 1999) pri čemu su autori naglasili da nisu

uočene statistički značajne razlike zasnovane u broju svake vrste leukocita u toku laktacije. Ovi nalazi ukazuju da postoje genetski zasnovane individualne varijacije u populaciji leukocita u mleku (Leitner i sa. 1999).

Većina imunoglobulina mleka potiče iz seruma, dok se sekretorni IgA i IgM sintetišu u samoj mlečnoj žlezdi i prelaze u mleko zajedno sa IgG antitelima. Imunoglobulini G su funkcionalno monomeri, imaju molekulsku masu od 150.000 i konstantu sedimentacije 7S. Ova populacija imunoglobulina sintetiše se u organizmu pri kraju imunološkog odgovora, a maksimalna sinteza se odigrava u toku sekundarne imunološke reakcije. (Stojić, 1999).

### **2.3. Analiza genetičke varijabilnosti**

U analazi genetičke varijabilnosti, naročito proizvodnih osobina koriste se morfometrijske, citogenetičke i biohemijske metode. Morfometrijske metode, odnosno metode analize morfoloških karakteristika, koriste se za analizu genetičke varijabilnosti ukoliko se zna priroda genetičke determinacije posmatrane osobine (Stanimirović i Stevanović, 2012). Citogenetičke metode, koje podrazumevaju analize kariotipa (hromozoma), omogućavaju otkrivanje promena u broju ili strukturi hromozoma kod jedinki ispitivane populacije (Stanimirović i sar, 1993, Soldatović i sar., 1993) Ove metode su omogućile veliki napredak u detekciji svih hromozomskih aberacija, a u programima selekcije izuzetno su značajne za otkrivanje heterozigotnih nosioca strukturnih hromozomskih aberacija, pre svega recipročnih i Robertsonovih translokacija i njihovo blagovremeno isključivanje iz odgajivačkog programa (Soldatović i sar. 1994a) Takođe, u slučaju numeričkih hromozomskih aberacija, citogenetička analiza daje zadovoljavajuće rezultate i može se koristiti za utvrđivanje numeričkih odstupanja od normalnog kariotipa (npr. kod monozomije X hromozoma kod kobilica,  $2n=63$ , XO; himerizma kod kobilica i pastuva; trizomije polnih hromozoma kod pastuva  $2n=65$ ; XXY i sličnih poremećaja kod drugih vrsta domaćih životinja) (Soldatović i sar., 1994b). Dijagnostika kariotipovanjem je teška, jer zahteva puno vremena, tehničkog rada, troškova i iskustva. Uzorci krvi za citogenetičku analizu zahtevaju posebnu temperaturu prilikom transporta i čuvanja. Takođe, problem može izazvati i kontaminacija krvi i medijuma. Inače, morfološki i hromozomski markeri obično pokazuju nizak nivo polimorfizma i stoga nisu posebno korisni kao genetički

markeri za analizu genetičke varijabilnosti. Biohemijske metode, odnosno analize proteinskih polimorfizama su dugo i obimno korišćene za utvrđivanje genetičke varijabilnosti zbog činjenice da promene nukleotidne sekvence DNK (tj. gena) mogu da dovedu do izmene primarne strukture kodiranog proteina. Analiza polimorfnih proteina krvi (tipizacija krvnih grupa) i polimorfnih tkivnih proteina obavljane su radi utvrđivanja i praćenja genetske strukture populacija. Međutim, nivo polimorfizama uočenih kod proteina je često nizak, što smanjuje upotrebljivost "tipovanja proteina" u proučavanjima diverziteta (Stanimirović i Stevanović, 2012). Danas se analize proteina smatraju prevaziđenom metodom zbog veoma niske rezolucije, odnosno zbog velikih ograničenja u ispitivanju genetičke varijabilnosti. Naime, analizom proteina mogu se detektovati samo neki genetički polimorfizmi. Jedan od razloga je izrođenost genetskog koda, zbog čega se ne mogu detektovati mutacije koje ne dovode do promene amino-kiselinske sekvence (tzv. *tihe mutacije*) čak i ako se obave analize amino-kiselinske sekvence. Drugi razlog je što su analize amino-kiselinskih sekvenci proteina veoma zahtevne (vremenski i finansijski), te se analize proteina najčešće obavljaju gel-elektroforezom, koja ima još nižu rezoluciju. Naime, elektroforeza se zasniva na tome da proteini, koji se razlikuju po sekvenci amino-kiselina, imaju različitu elektropokretljivost (na gelu u rastvoru slabog elektrolita). Drugim rečima, elektroforetska separacija proteina zasniva se na razlikama u električnom naboju ili razlikama u molekulskim masama kod različitih proteina. Međutim, takvom analizom se ne može detektovati svaka promena u sekvenci amino-kiselina, jer se neke zamene amino-kiselina ne odražavaju na elektroforetsku pokretljivost proteina (ukoliko se jedna amino-kiselina u proteinu zameni nekom hemijski bliskom amino-kiselinom). Konačno, navedeni metode omogućavaju analizu varijabilnosti samo u kodirajućim regionima DNK, koje predstavljaju manje od 10% ukupnog genoma kod sisara. Molekularno-genetičke metode predstavljaju metode izbora za analizu genetičke varijabilnosti, obzirom da se njima otkrivaju razlike u samom molekulu DNK (tzv. DNK polimorfizmi) koji podrazumevaju svaku razliku u nukleotidnoj sekvenci (unutar gena i/ili nekodirajućih regiona DNK). Markerima kojima se detektuju razlike na nivou DNK nazivaju se molekularni ili DNK markeri (Ivanković, 2005). Molekularni markeri, sposobni da detektuju genetičke varijacije na nivou sekvenci DNK, ne samo da su prevazišli ograničenja prethodno korišćenih metoda (morfometrijske, citogenetičke,

biohemijske), nego poseduju i jedinstvena genetička svojstva koja ih čine mnogo korisnijim od ostalih genetičkih markera. Oni su brojni i raspoređeni svuda po čitavom genomu. Nasleđuju se po Mendelovim pravilima, najčešće ko-dominantno i često su multialelni tako da se u proseku heterozigotnost ostvaruje u više od 70%. Na njih ne utiču faktori spoljašnje sredine i generalno nemaju plejotropni efekat na lokuse za kvantitativne osobine (quantitative trait loci-QTL). Obzirom da genska ekspresija nije preduslov za analizu DNK metodama savremene genetike, korišćenjem molekularnih markera može se vizuelizovati praktično celokupan genom uključujući nekodirajuće regione (Stanimirović i Stevanović, 2012). Brzi razvoj molekularne genetike tokom poslednje tri decenije omogućio je direktnu analizu genoma životinja, proučavanje strukture i funkcije gena, pa samim tim pomogao boljem razumevanju delovanja nasledne osnove. Molekularno-genetičke metode omogućile su uvid u nekodirajuće delove genoma, koje kod sisara čine više od 90%. DNK zapisa (Ivanković, 2005). Zbog svega navedenog, molekularno-genetičke analize nalaze primenu u svim oblastima veterine, kao što su: dijagnostika naslednih bolesti (Soldatović i sar., 1994a i 1994b), determinacija pola ptica (Vučićević i sar., 2012), provera roditeljstva i verifikacija pedigreea (Stevanović i sar., 2010), determinacija uzročnika virusnih, parazitskih i bakterijskih infekcija (Stevanović i sar, 2011, Gajić i sar., 2013, Glavinić i sar., 2014), otkrivanje genskih lokusa vezanih za ekonomski značajne proizvodne karakteristike (Maletić i sar., 2013), forenzičke analize (Dimtrijević i sar., 2013). Posebno značajna oblast primene molekularno-genetičkih analiza u veterinarskoj medicini je molekularna dijagnostika koja podrazumeva otkrivanje mutacija koje su uzrok naslednih bolesti i utvrđivanje prisustva uzročnika infektivnih bolesti. Molekularno-genetičke metode u veterinarskoj medicini omogućile su znatno precizniju, bržu, jednostavniju i finansijski isplativiju dijagnostiku u odnosu na tradicionalne metode (Schmitt i Henderson, 2005; Uffo i Acosta, 2009).

#### **2.4. Kandidat geni za mastitis i polimorfizam LTF gena**

Tokom poslednjih nekoliko decenija u mlečnom govedarstvu desile su se ozbiljne promene u pristupu gajenja mlečnih grla. Ove promene odnose se na uslove držanja, ishrane i nege, ali najveći pomak doneli su novi pristupi u pogledu genske selekcije

mlečnih grla na visoku proizvodnju mleka. Visoka proizvodnja povlači za sobom veću incidenciju pojavljivanja oboljenja mlečne žlezde (Owen i sar., 1999). U intenzivnim uslovima gajenja ustanovljena je korelacija između visoke proizvodnje mleka i pojave oboljenja mlečne žlezde (Rogers i sar., 1991, Shutz i sar., 1994). Price i sar. (1998) su na velikom uzorku krava iz 33 stada sa različitim brojem laktacija dokazali da svakom sledećom laktacijom raste verovatnoća oboljenja mlečne žlezde. Oni su izračunali da genska korelacija između broja somatskih ćelija u mleku i pojave mastitisa iznosi 0,65 i preporučili da se vrednosti broja somatskih ćelija (SCC - *somatic cell count*) koristi kao kriterijum za selekciju mlečnih krava. Neka istraživanja ukazuju da se u selekciji mlečnih krava na otpornost na mastitis može koristiti dubine vimena i dužina sisa (Rogers i sar. 1991), oblik vrha i promera sisa (Chrystal i sar., 1999) kao i udaljenost vrhova sisa od poda (Cergolj i sar., 2004). Međutim, ovako primenjivani principi fenotipske selekcije nisu našli značajnijeg udela u selekciji krava na pojavu oboljenja mlečne žlezde. U slučajevima gde se prate osobine koje su generalno sa niskim heritibilitetom, kao što je slučaj sa otpornošću na mastitis, MAS (marker asistirana selekcija) ili genomska selekcija pokazale su bolji rezultat u odnosu na konvencionalni metod selekcije. Primarni cilj u ispitivanju kandidat-gena povezanih sa pojavljivanjem mastitisa je identifikacija gena koji su uključeni u proces imunog odgovora mlečne žlezde. U literaturi se navodi više kandidat markera za mastitis (Pighetti i Elliott, 2012). Ogorevc i sar. (2009) su pratili ekspresiju gena povezanih sa oboljenjima mlečne žlezde goveda, navodeći da je do sada ispitano 943 kandidat gena, odnosno povezanost njihove ekspresije sa razvojem mlečne žlezde, produkcijom mleka, osetljivošću i rezistencijom na mastitis. Navedeni autori ističu da od toga 15 kandidat gena (BoLA-13, IL8RA, TLR4, C5AR1, CD14, IFNG, IL1B, IL6, IL8, LBP, SAA3, TLR2, TLR4, TNF, LTF,  $\beta$ -4 defensin) može da bude iskorišćeno u praćenju, kako mehanizma nastanka same infekcije, tako i prirodne otpornosti krava na mastitis (Ogorevc i sar., 2009).

Kandidat geni su prethodno identifikovani geni sa poznatom biohemijskom funkcijom koji mogu uticati na neko svojstvo. Ukoliko bi gen iz npr. jedne vrste životinja pokazivao visoki stepen homologije i određivao vrlo sličan fenotip, tada bi takav gen mogao biti kandidat gen za određeno svojstvo kod neke druge vrste životinja. Polimorfne varijante kandidat gena mogu se otkriti sekvenciranjem kodirajuće sekvence. Polimorfni DNK markeri koji su susedni kandidat lokusu mogu se takođe

koristiti kao tip polimorfnih varijanti. Potom se statističkom analizom (npr. analizom varijanse ili regresijom) utvrđuje učinak kandidat gena na varijabilnost kvantitativnog svojstva, pri čemu se za analizu koriste fenotipska karakteristika za svojstvo od interesa i genotipa na kandidat lokusu. Ukoliko je fenotipska distribucija svojstava između grupa genotipova značajno različita, smatra se da kandidat gen ima značajan uticaj na istraživano svojstvo ili se može povezati kroz neravnotežu povezanosti (LD, eng.=linkage disequilibrium) sa nekim drugim lokusom koji ima fiziološki efekt (Blangero i sar. 1992). Ukoliko se utvrdi neravnoteža povezanosti, kandidat gen se smatra markerom tesno vezanim uz gen koji kontroliše svojstvo, a ukoliko nema ravnoteže, populacija se nalazi u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži na nivou gena, kandidat gen je uzrok fenotipske različitosti ili veza uopšte ne postoji (Kušec, 2007). S obzirom na dug generacijski interval, visoku vrednost svake jedinice, ali ograničene reproduktivne karakteristike krava, model marker-asistirane selekcije se pokazao kao vrlo prihvatljiv u programima selekcije goveda u intenzivnim uslovima držanja. Primena molekularne genetike u programima genetskog unapređenja zasniva se na individualnim razlikama između jedinki za specifične genske lokuse. U ovu svrhu mogu se koristiti 3 vrste polimorfnih genskih markera: direktni, kojima se otkrivaju funkcionalne mutacije, LE markeri koji su povezani sa kodiranjem određenih kvantitativnih osobina (QTL-*quantitative trait loci*) i LD markeri, koji se identifikuju upotrebom kandidat gena ili finim mapiranjem (Anderson, 2001). Prednost imaju direktni i LD markeri zbog dosledne povezanosti genotipa i fenotipa. Poznato je da se genetski markeri koji su značajni za praćenje zdravlja i reproduktivnih parametara ne koriste u procesima MAS u kojima su osnova proizvodni rezultati. Zbog toga, veoma je važno da se uspostavi povezanost između gena vezanih sa zdravljem i proizvodnim performansama istovremeno. U okviru većeg broja studija, praćen je efekat nekih gena, kao što su IGF i »predački gen« – TF, i njihov uticaj na proizvodne karakteristike uprkos njihovom primarnom uticaju na zdravlje, rast i reprodukciju (Sanz i sar. 2010, Szewczuk i sar. 2012). Ovo ukazuje na pleotropni efekat, odnosno da postoji povezanost između gena koji kodiraju neproduktivne karakteristike i karakteristike vezane za visoku proizvodnju mleka.

Gen za bovini laktoferin je mapiran na hromozomu 22q24 i obuhvata 17 egzona. U genskoj banci nalaze se sekvence gena u kojima su se desile mutacije, a mesta promene

prepoznaje restrikcioni enzim *Eco RI*. Enzim *Eco RI* izolovan je iz bakterije *Escherihia coli*. Ovaj restrikcioni enzim preopznaje specifičnu sekvencu nukletioda na jednom lancu DNK (GAATTC) i vezuje se za restrikciono mesto između G i A baze. Restrikciono mesto ovog enzima je specifično u odnosu na druge enzime koji se koriste u procesima rekombinacije DNK. Na LTF lokusu pronađena su 2 alela A i B, koji daju 3 moguća genotipa AA, AB, BB. ( Seyfert i Kuhn 1994, O Halloran, 2009). Arnould i sar. su 2009. godine objavili rad u kome su naveli da postoji polimorfizam gena za laktoferin na egzonu 2 i 11 i na intronu 8. Doust (2014) izveštava da se polimorfizmi gena za LTF dešavaju i u kodirajućim i u regulatornim regionima (introni i egzoni). Lee i sar. (1997) su pronašli polimorfizme na egzonu 4, 8, 9, 11 i 15 i na intronu 4 LTF gena. Mutacija na intronu 4 dovodi do zamene aminokiseline izoleucin u valin. Potvrđeno je da se gen za laktoferin nasleđuje kodominantno po Mendelovim pravilima nasleđivanja. Regulacija sinteze laktoferina je vrlo kompleksna i odnosi se na uticaj hormonske stimulacije, infekciju, različite stadijume ćelijske diferencijacije i ishrane (Cloose i sar., 1997, Teng i sar., 2002 i Zheng i sar., 2005).

## 2.5. Laktoferin

Laktoferin (LTF) je bioaktivni glikoprotein pronađen u mnogim egzokrinim sekretima uključujući suze, pljuvačku, mleko, sekret genitalnog trakta. Postoji veći broj radova koji se bazira na njegovom antibakterijskom delovanju *in vitro* i *in vivo*. Sorenson i Sorenson su prvi izolovali laktoferin, iz mleka goveda, 1939. godine. Istovremeno je (1960. godine), dokazan u tri nezavisne laboratorije kao glavni protein u humanom mleku koji vezuje gvožđe (Groves, 1960, Johanson 1960, Montreuil i sar. 1960). Zahvaljujući porastu koncentracije LTF tokom većine inflamatornih procesa i nekih virusnih infekcija, nekoliko autora klasifikovalo je laktoferin kao jedan od proteina akutne faze (Gonzales-Chavez i sar, 2009). Porast koncentracije je u svim biološkim tečnostima, ali najviši nivo je detektovan u samom središtu inflamacije. Na taj način, LTF ima širok spektar bioloških funkcija, koje nisu isključivo vezane za adherenciju molekula gvožđa (Kanyšchova i sar. 2001).

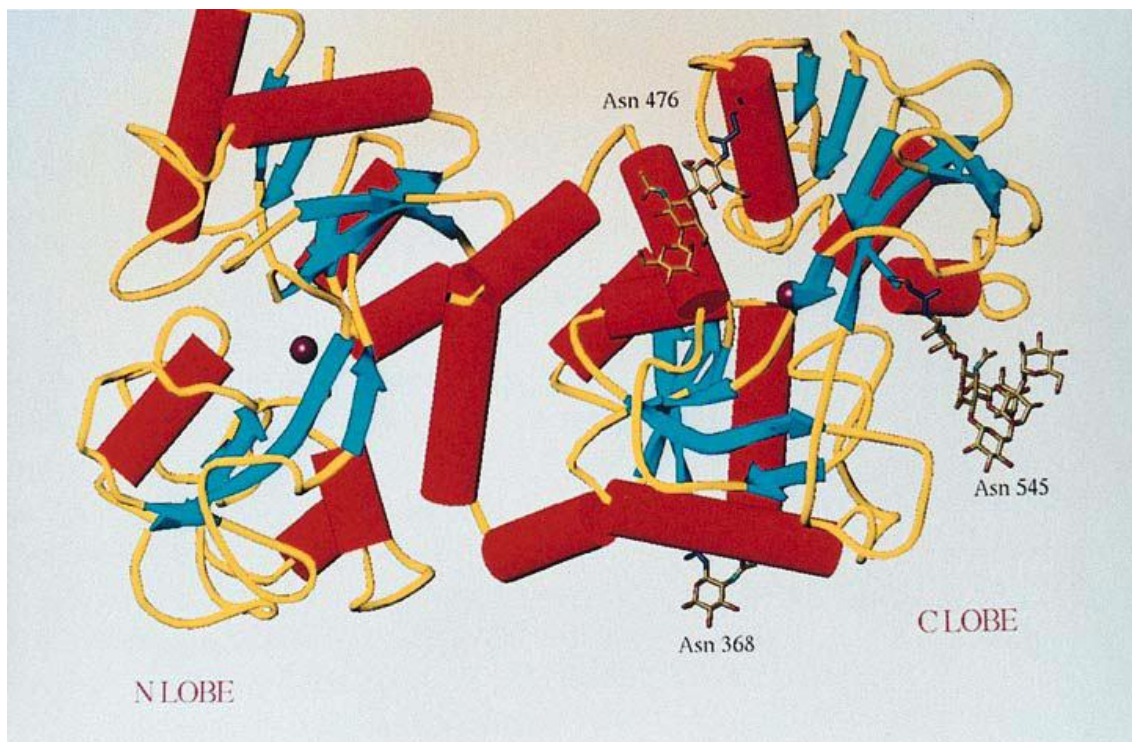
### 2.5.1. Struktura i osobine laktoferina

Laktoferin je glikoprotein sa molekulskom masom od 80 kDa, koji pokazuje visok afinitet za gvožđe. Molekularna struktura i redosled aminokiselina koje ulaze u sastav humanog laktoferina otkrivena je 1984. godine (Metz- Bothigue i sar, 1984). Laktoferin je član familije transferina, jer se njegova struktura 60 % poklapa u sastavu sa tranferinima iz seruma (Goodman i Shambacher, 1991).

Izolovane su tri različite izoforme laktoferina. Laktoferin- $\alpha$  je forma koja vezuje gvožđe, ali bez ribonukleazne aktivnosti, dok laktoferin- $\beta$  i laktoferin- $\gamma$  pokazuju ribonukleaznu aktivnost, ali oni nemaju mogućnost vezivanja gvožđa (Furmanski i sar, 1989).

Laktoferin obuhvata jednostruki polipeptidni lanac, koji se sastoji od 703 amino kiseline, podeljen u dva globularna lobusa (režnja) (Goodman i Schanbacher, 1991). Ovi lobusi, C- (karboksi) i N- (amino) terminalni regioni, su povezani sa  $\alpha$ -heliksom. Svaki lobus sadrži dva domena, poznati kao C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, N<sub>1</sub> i N<sub>2</sub>. Domeni kreiraju jedno mesto za vezivanje gvožđa na svakom lobusu. Molekul laktoferina sadrži (u skladu sa vrstom i proteinom) različit broj mesta za potencijalnu glikozilaciju, većinom na površini molekula. Najčešći saharid je manozna, oko 3% su heksoze, i 1% heksozamini. Step glikozilacije varira i određuje step rezistencije na proteaze ili na veoma nizak pH (Moore i sar. 1997).





Slika 2. Struktura molekula laktoferina (preuzeto P. Hyvonen, doktorska disertacija, 2010.)

Sposobnost laktoferina da vezuje gvožđe dva puta je veća nego kod transferina, koji mogu u nekim slučajevima da posluže kao donori  $\text{Fe}^{3+}$  jona za laktoferin. Jedan molekul laktoferina može da veže dva  $\text{Fe}^{3+}$  jona. Jedan karbonatni jon uvek je istovremeno vezan laktoferinom za svaki  $\text{Fe}^{3+}$  jon. Mada je ova veza veoma snažna i može biti rezistentna na pH vrednosti i do 4, zasićenost ne može biti iznad 10% ukupno (Mazurier i Spik, 1980). Postoje tri forme LTF u skladu sa njegovom zasićenošću gvoždem: apolaktoferin (gvožđe slobodan), monofero forma (jedan  $\text{Fe}^{3+}$  jon) i halolaktoferin (vezuje dva  $\text{Fe}^{3+}$  jona). Tercijarna struktura halolaktoferina i apolaktoferina je različita (Jamenson i sar., 1998). Za vezivanje gvožđa najvažnije su četiri rezidue amino kiseline (histidin, dvostruki tirozin i aspartanska kiselina), dok je argininski lanac odgovoran za vezivanje karbonatnog jona (Baker, 1994). Pored gvožđa, laktoferin je sposoban da vezuje velike količine drugih jedinjenja i supstanci, kao što su lipopolisaharidi, heparin, glikozaminoglikani, DNK, ili drugi joni metala kao što su  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  itd. Međutim, njegov afinitet za ove druge jone je znatno niži. Pored  $\text{CO}_3^{2-}$ , laktoferin može da vezuje različite anjone, kao što su oksalati,

karboksilati i dr. Na ovaj način, laktoferin može da utiče na metabolizam i distribuciju različitih supstanci (Baker, 1994).

Sposobnost čuvanja veze sa gvožđem čak i pri niskom pH, veoma je važna, naročito na mestu infekcije i inflamacije gde, zahvaljujući metaboličkoj aktivnosti bakterija, pH može pasti ispod 4.5. U ovakvim situacijama, laktoferin takođe vezuje gvožđe koje otpusti transferin, što omogućava njegovo dalje delovanje u cilju inhibicije rasta bakterija (Valenti i Antonini, 2005). Pokazalo se da je laktoferin značajno rezistentan na razgradnju proteazama, pomoću tripsina i enzima sličnih tripsinu, (Iyer i Lonnerdal, 1993).

### **2.5.2. Izvori laktoferina u organizmu ljudi**

Ekspresija LTF može biti prvo detektovana kod dvo- i četvoro-ćelijskih embiona tokom embrionalnog razvoja, zatim tokom stadijuma blastociste do implantacije. Laktoferin ne može biti detektovan od vremena implantacije do polovine gestacije. Kasnije, nalazi se u neutrofilima i epitelnim ćelijama formiranog reproduktivnog i digestivnog sistema (Ward i sar, 1996).

Kod ljudi najviši nivo laktoferina prisutan je u mleku i kolostrumu. Takođe se može naći u većini mukoznih sekreta kao što su uterusne tečnosti, vaginalni sekreti, semena tečnost, pljuvačka, žuč, pankreasni sok, sekreti tankih creva, nazalni sekreti i suze (Lonnerdal i Iyer, 1995; Kikuchi i sar., 2003).

Abrink i sar. (2000) su opisali proizvodnju laktoferina u bubrezima. LTF se eksprimira i sekretuje u sabirnim tubulima i u distalnom delu tubula može se reapsorbovati. Njihovi rezultati su pokazali da bubrezi proizvode LTF na specifičan način i samo mala frakcija ovog proteina sekretuje se u urin. Zato, LTF ima važnu funkciju u imunoj odbrani urinarnog trakta i generalnom metabolizmu gvožđa.

LTF je prisutan u relativno niskim koncentracijama u krvi, plazmi ili serumu (Rumke i sar., 1971, Chung i sar, 1985, Scott 1989). Značajna razlika između rezultata (varira od 0.02 µg/ml do 1.52 µg/ml u krvi) koje su objavili navedeni autori, verovatno je izazvana upotrebom različitih analitičkih metoda, tipa antikoagulanata, razlike u zasićenosti LTF gvožđem, spontanoj polimerizaciji i intervala između saklupanja

uzoraka i analize ili skladištenja. Koncentracija LTF u plazmi može i ne mora biti u vezi sa brojem neutrofila (Baynes i sar., 1986). Koncentracija LTF u krvi raste tokom infekcije, inflamacije, prekomernog unosa gvožđa ili rasta tumora (Levay i Viljoen, 1995).

### **2.5.3.Regulacija sinteze laktoferina**

Regulacija sinteze LTF zavisi od tipa ćelije koja proizvodi ovaj protein. Količina sintetisanog LTF u mlečnoj žlezdi kontrolisana je prolaktinom (Green i Pastewka, 1978) dok je proizvodnja LTF u reproduktivnim tkivima regulisana estrogenom (Teng i sar., 2002). Sinteza LTF u endometriju stimulisana je estrogenom ali i epidermalnim faktorom rasta (Nelson i sar., 1991). Egzokrine žlezde proizvode i sekretuju LTF na kontinuiran način. U neutrofilima, sintetiše se tokom njihove diferencijacije (kada se promijelociti razvijaju u mijelocite) i zatim se skladišti u specifičnim granulama. Zreli neutrofili završavaju sa proizvodnjom LTF (Masson i sar., 1969).

Nivo LTF u plazmi kod žena menja se od samog početka graviditeta. Zapaža se progresivni rast koncentracije do 29-e nedelje, nakon čega se postavlja na konstantan nivo koji je viši od prosečnog (Sykes i sar., 1982). Nekoliko faktora mogu uticati na ovaj porast: leukocitoza koja je udružena sa trudnoćom, selektivni porast LTF u neutrofilnim granulama ili drugim organima kao što je endometrijum, posteljica i mlečna žlezda (Levay i Viljoen, 1995).

Biološke funkcije LTF su posredovane specifičnim receptorima na površini target ćelija. Ovi receptori su tipični za svaki tip ćelija i mogu se naći na mukoznim epitelnim ćelijama, hepatocitima, monocitima, makrofagima, polimorfonuklearnim leukocitima, limfocitima, trombocitima, fibroblastima i nekim bakterijama kao što su *Staphylococcus aureus* ili *Pseudomonas hydrophila*. Neke ćelije takođe imaju „glavne receptore“, koji ih osposobljavaju da vežu ne samo LTF nego i transferin ili laktoferine drugih vrsta (Levay i Viljoen, 1995, Suzuki i Lonnerdal, 2002).

#### 2.5.4. Laktoferin kod životinja

Laktoferin kod životinja sintetišu neutrofilni granulociti, makrofagi i epitelne ćelije vimena (Harmon, 1980). Količina laktoferina u mleku krava varira od 0,02-0,035 mg/ml, u zavisnosti od stadijuma laktacije. Glavna funkcija laktoferina je da zaštiti mlečnu žlezdu od infekcije koliformnim mikroorganizmima, posebno u fazi involucije, aktivacijom fagocitoze i sistema komplementa. Conecely (2001) iznosi da laktoferin pripada grupi transferin proteina zajedno sa transferin proteinima u jajetu (ovotransferin), melanocitnim proteinom (melanotransferin) itd. Za laktoferin se vezuje veliki broj uloga između ostalog, reguliše apsorpciju gvožđa iz creva, podstiče rast ćelija epitela creva, ima zaštitnu ulogu protiv bakterijskih infekcija. Ova uloga laktoferina dokazana je i u *in vivo* i *in vitro* uslovima (Hagiwara i sar, 2003, Suzuki i sar 2005). Bakteriostatska uloga definiše se sposobnošću laktoferina da vezuje gvožđe u medijumu i na taj način onemogućuje dalji rast bakterija. Gvožđe je vrlo bitan element za rast većine bakterija. Izvan organizma, bakterije su izložene uslovima u kojima je nizak nivo gvožđa, zbog prisustva gvožđe vezujućeg proteina koji su zasićeni jonima gvoždja svega 30-40%. Bakteriostatska forma LTF je ili *apo*-LTF ili delimično zasićen LTF zbog toga što potpuno zasićena forma nema antimikrobnu aktivnost (Bishop i sar., 1976, Arnold i sar., 1982). LTF ima tendenciju interakcije sa negativno naelektrisanim komponentama ćelijske membrane bakterija. Arnold i sar. (1982) izveštavaju o direktnoj interakciji *apo*-LTF sa različitim sojevima mikroorganizama, koja rezultira inhibicijom njihovog rasta. LTF prouzorkuje narušavanje lipoproteinskog sastava ćelijske membrane gram-negativnih bakterija, što rezultuje povećanjem permeabiliteta iste (Ellison i sar., 1988) Ova uloga laktoferina je u pojedinim situacijama ograničena jer pojedine gram negativne bakterije su adaptirane na nedostatak gvožđa. Za bakteriocidnu ulogu laktoferina zadužen je N-terminalni kraj ovog proteina koji konformacijski može da se veže za određena mesta na ćelijskoj membrani bakterija i dovede do nastanka oštećenja a samim tim i neutralisanja samih bakterija. U radu Conecely-a (2001) istaknuta je i imunomodulatorska uloga laktoferina koji inhibira lučenje dva vrlo potentna medijatora zapaljenja, TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ .

Sam LTF deluje uglavnom bakteriostatski, ali sa drugim antimikrobnim proteinima kao što je lizozim, ima sinergistički efekat i deluje baktericidno na gram-negativne bakterije (Ellison i Giehl, 1991). *E. coli* i mnoge druge gram-negativne

bakterije imaju površinske receptore, porine, koji formiraju propustljivu barijeru za ulazak hranljivih supstanci i antibiotika preko spoljašne membrane bakterija. LTF prepoznaje ove porine i ima mogućnost vezivanja za njih (Erdei i sar., 1994).

Pored bakteriostatskog dejstva, laktoferin ima sposobnost da zaštiti parenhim mlečne žlezde od štetnog delovanja slobodnih radikala kiseonika (Legrand, 2004). Njegovu bakteriostatsku aktivnost inhibira citrat, koji se nalazi u mleku i kolostrumu, u znatno višoj koncentraciji od laktoferina. Aktivnost laktoferina je najveća u periodu zasušenja, kada je njegova koncentracija u sekretu mlečne žlezde najveća i iznosi 20-100 mg/ml. Istovremeno je koncentracija citrata smanjena, dok je koncentracija bikarbonata povećana (Legrand i sar., 2004). Koncentracija laktoferina počinje da raste 2-4 dana od prestanka muže i linearno se povećava u toku perioda zasušenja, kao posledica povećane neto sinteze laktoferina u periodu involucije vimena. Tsuji i sar. (1990) u svom radu navode da je koncentracija LTF 2 do 3 puta veća kod multiparnih nego kod uniparnih krava. Visok nivo LTF u kolostrumu primećen je u drugoj laktaciji. Hagiwara i sar. (2003) izveštavaju da je koncentracija LTF u mleku statistički značajno povezana sa starošću ali ne i sa stadijumom laktacije. Do relevantnih podataka vezano za stadijum laktacije nije se moglo doći jer je uzet relativno mali broj uzoraka poreklom iz različitih mamarnih kompleksa. Takođe, u istom istraživanju Hagiwara i sar. (2003) ustanovljeno je značajno povećanje koncentracije laktoferina kod infekcije mlečne žlezde specifičnim patogenima (*Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*) u odnosu na infekciju drugim patogenima. Istraživanja Oliver i sar. (2000) ukazuju da laktoferin može da deluje kao stimulator procesa fagocitoze bakterija i omogućava njihovo uklanjanje iz vimena. Laktoferin samostalno deluje bakteriostatski, ali delujući sinergistički sa lizozomom pokazuje baktericidni efekat prema gram negativnim bakterijama (Ellison i Giehl, 1991).

Bakterije mogu da razviju nekoliko mehanizama za vezivanje gvožđa. U fiziološkim uslovima u organizmu gvožđe je proteinski vezano, sa ciljem da se smanji koncentracija neželjenih slobodnih radikala. U odgovoru na gvoždem-inhibiran stres, neke bakterije sintetišu određene helatne supstance, nazivaju se siderofore koje su sposobne da vezuju Fe (Bullen i sar., 2005). Ove bakterije obično poseduju određene membranske proteine koji imaju funkciju receptora u kompleksima gvožđe-siderofora.

Na primer, *E. coli* proizvodi helate enterobaktin i aerobaktin (Bullen i sar., 2005) i eksprimira receptore za Fe na membrani ćelije kao što je enterobaktin receptor FepA (Lin i sar., 1998) i Fe-citrat receptor FecA (Lin i sar., 1999). Mnoge bakterije imaju specifične spoljašnje receptore koji direktno vezuju Fe i ovi receptori su uglavnom protein-specifični ili specijes-specifični (Schryvers i Morris, 1988)

Pored antibakterijskog pokazuje i antivirusno, fungicidno, antiparazitsko dejstvo kao i katalitički efekat u enzimskim reakcijama. Smatra se da ima i antitumorski i imunomodulatorni efekat (Adlerova i sar, 2008, Pawlik i sar, 2009). Zagulski i sar. (1989) pokazali su da postoji protektivni efekat laktoferina tokom letalne bakterijemije. Protektivni efekat laktoferina podrazumeva inhibiciju produkcije nekoliko proinflamatornih citokina, uključujući tumor-nekrozis faktor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) i IL-6 (Crouch i sar., 1992; Machnicki i sar., 1993; Haversen i sar., 2002). LTF menja imunski odgovor neutralisanjem slobodnih radikala (Britigan i sar., 1989). Pojedini autori svrstavaju laktoferin u proteine akutne faze jer dolazi do povećanja njegove koncentracije tokom akutne inflamatorne reakcije i odgovora organizma na virusne infekcije (Kanyshkova i sar., 2001). Na celularnom nivou, LTF menja funkciju antigen-prezentujućih ćelija, uključujući migraciju i aktivaciju istih (Puddu i sar., 2009) Mleko je jedan od najvažnijih izvora laktoferina. Za razliku od drugih proteina prisutnih u mleku, LTF se sekretuje najviše u mamarnim epitelnim ćelijama tokom svih faza laktacije, uključujući i period zasušenja i laktacije. LTF je prisutan u mleku žene, krmače, kobile, krave, bufala, ovce, koze, kamile, miša, slonice i lame (Stumpf i Welch, 2004; Baker, 2005; Conesa i sar., 2008). Kravlje mleko sadrži 30 to 35 g/l proteina. Proteini se mogu podeliti na kazein, koji čini 80% proteina mleka, i proteine surutke, koji čine preostalih 20% (Swaigood, 1992). LTF u mleku je u vezi sa proteinima surutke oko 70%, a 30% je u vezi sa kazeinom (Oram i Reiter, 1968). Oko 0,75% proteina surutke čine  $\beta$ - i  $\alpha$ -laktoglobulini (70-90%), imunoglobulini (10-15%), bovini serum albumin (5-6%)  $\beta$ -kazein (1-2%) i drugi proteini <0, 5%. Ovu grupu drugih proteina čine biološki aktivni proteini, između ostalih i LTF, kao i enzimi laktoperoksidaza i lizozim (Korhonen, 1995). Kod kravljeg mleka kao komercijalno najzastupljenijeg, nivo laktoferina kod zdrave jedinke se kreće u opsegu od 0,02 do 0,2 mg/kg pri čemu se dramatično povećava kada je u pitanju zapaljenjski proces lociran u vimenu (O Halloran, 2009). Ono što je možda zanimljivo istaći je da se koncentracija laktoferina dramatično povećava

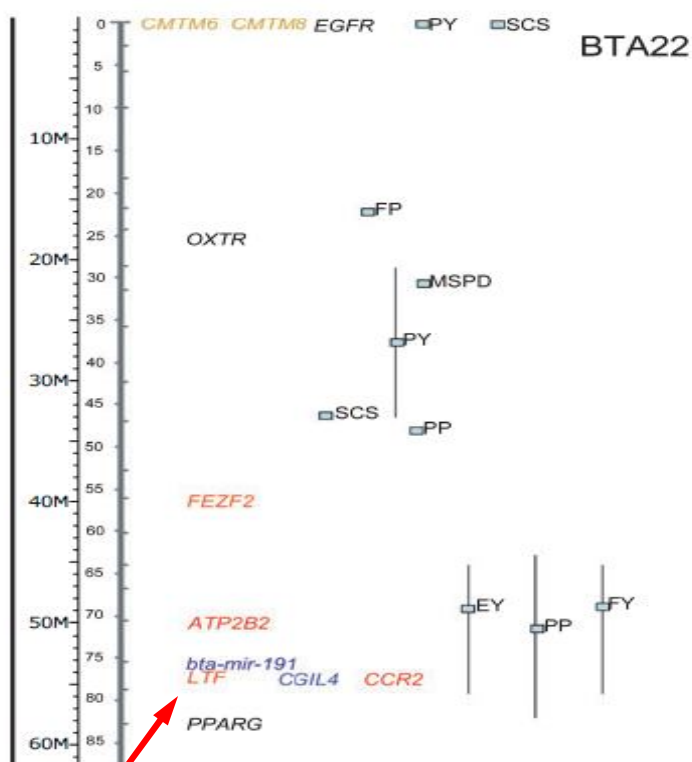
kada je u pitanju infekcija određene četvrti *Streptococcus uberis*-om ali ne postoji signifikantno povećanje u koncentraciji ovog proteina kod drugih uzročnika bolesti (Pawlik i sar., 2009). Laktoferin inhibira *in vitro* rast određenih prouzrokovaca i najjača aktivnost uočena je prema *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* (Kutilla 2004, Chaneton i sar., 2008). Postoje varijabilni rezultati kada je u pitanju mastitis prouzrokovan *Staphylococcus aureus*-om i *Klebsiella pneumoniae*. Kod krava sa mastitisom laktoferin se bori za gvožđe sa bakterijama i njegova povezanost sa infekcijom vimena može imati teoretski i praktični značaj (Zhao i sar., 2008, 2009; O' Halloran i sar., 2009, Wojdacz Maksymiec, 2012). Guo (2010) ističe da je bovini i humani LTF značajan anabolički faktor u koštanom tkivu i deluje stimulativno na proliferaciju osteoblasta i hondrocita u *in vitro* uslovima. Lokalno aplikovan LTF kod odraslih miševa stimuliše rast kostiju što ukazuje na uticaj LTF na rast kostiju i moguću primenu u terapiji osteoporoze. Poslednje studije ukazuju da LTF stimuliše transkripciju imunski važnih gena u tankim crevima teladi (Yamauchi i sar., 2006)

Koncentracija laktoferina u kravljem mleku varira u zavisnosti od faze razvoja mlečne žlezde i njene funkcije. Koncentracija LTF smanjuje se dva dana posle porođaja, sa 1-2 mg/ml u kolostrumu, na 0.01-0.1 mg/ml tokom rane laktacije. U procesima involucije mlečne žlezde, koncentracija LTF se povećava postepeno do maksimalnih koncentracija, koje iznose 20 mg/ml do 100 mg/ml (Schanbacher i sar., 1993). Povećanje koncentracije počinje 2 do 4 dana nakon početka zasušenja i nastavlja se svakodnevno povećanje za 1, 15 mg/ml tokom prvih 14 do 21 dan zasušenja. Maksimalna koncentracija LTF se očekuje oko 3 do 4 nedelje zasušenja (Welty i sar., 1976). Kolostrum je prva prirodna hrana za novorođeno tele, i sadrži nekoliko aktivnih molekula specifične funkcije, uključujući faktore rasta i antimikrobne supstance, značajne za proces pasivne imunizacije i zaštitu od infektivnih agenasa u toku prve nedelje života. Antimikrobna aktivnost kolostruma se uglavnom zasniva na delovanju imunoglobulina, ali kolostrum sadrži i druge antimikrobne faktore kao što je LTF, lizozim i laktoperoksidaza. Tsuji i sar. (1990) pronašli su dve različite izoforme LTF, A i B, u kolostrumu. Koncentracija LTF-B bila je duplo veća od LTF-A, i antimikrobna aktivnost prema *E. coli* bila je u korist LTF-A u odnosu na LTF-B. Koncentracija LTF-A u kolostrumu je veća nego u nepromenjenom mleku, i LTF-A može imati značajnu antimikrobnu ulogu kod novorođene teladi (Tsuji i sar., 1990). Kod mlečnih krava, koncentracija LTF u kolostrumu varira značajno između vrsta ali i jedinki: multipare krave imaju dva do tri puta veću koncentraciju LTF od priparnih. Kod tovnih rasa, nema

značajne razlike u koncentraciji LTF u kolostrumu u odnosu na paritet (Tsuji i sar, 1990). Koncentracija LTF u mleku mlečnih krava je četiri puta veća u odnosu na tovne (Gaunt i sar., 1980). Sa druge strane, Hagiwara i sar. (2003) došli su do zaključka da je koncentracija LTF u mleku značajno povezana sa starošću krave, ali ne i sa fazom laktacije. Ipak, postoji tendencija povećanja koncentracije laktoferina u ranim fazama laktacije u odnosu na središnji i završni period (Hagiwara i sar., 2003). U vezi sa tim Cheng i sar. (2008), izveštavaju da je koncentracija LTF zavisna od stadijuma laktacije, ali ne i od pariteta. Takođe, isti autori su utvrdili da postoji negativna korelacija između koncentracije LTF i laktoze. Ovo može biti povezano sa rastom SCC koji inhibira proizvodnu aktivnost tkiva mlečne žlezde. Korhonen i Kaartinen (1995) pronašli su da je porast SCC uglavnom povezan sa padom laktoze u poređenju sa normalnim, nepromenjenim mlekom. Lindmarh-Mansson (2000) izveštavaju da je porast SCC povezan sa padom mlečnosti i promenama u sastavu mleka. Rezultat povećanog broja SCC je i porast broja polimorfonukleara koji su bitni za sintezu LTF. Król et al. (2010) došli su do zaključka da rasa ima značajnog uticaja na koncentraciju LTF, i mleko poreklom od Simentalskih i Džerzej krava predstavlja dobar izvor LTF.

Regulacija funkcije LTF u mlečnoj žlezdi suštinski se razlikuje između vrsta. Aktivnost gena za LTF je jako osetljiva na estrogenu stimulaciju u reproduktivnim organima ljudi i miševa kao što su mlečna žlezda i uterus (Teng i sar., 2002b; Teng, 2006). Koncentracija LTF u sekretu mlečne žlezde žene i krave tokom razvoja, laktacije i involucije mlečne žlezde se suštinski razlikuje, ali je dijagram promene koncentracije jako sličan; involucija inicira povećanje koncentracije LTF, slično kod obe vrste (Lonnerdal i sar., 1976, Welty i sar., 1976). Wang i sar. (2005) pronašli su da gvožđe dodato u hrani, značajno povećava ekspresiju LTF u mlečnoj žlezdi.





Slika. Mesto lokalizacije LTF gena na 22 hromozomu goveda (preuzeto iz Ogorevc J., Kunej T., Razpet A., Dovc P. (2009) Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis, Animal Genetics, vol. 40, 832-857 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2052.2009.01921.x/pdf>)

### 3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada je ispitivanje povezanosti genetskog polimorfizma laktoferin (LTF) gena sa zdravstvenim stanjem mlečne žlezde, kvalitetom mleka i proizvodnim karakteristikama HF krava.

Za ostvarenje postavljenog cilja realizovani su sledeći zadaci:

1. Formiranje grupe do 100 krava HF rase starosti 2-7 godina držanih u kontrolisanim uslovima gajenja na farmama u blizini Beograda (Ad Napredak Stara Pazova, 1 i 2).
2. Uzorkovanje krvi od svih jedinki u ogledu za ekstrakciju DNK za potrebe analize LTF gena.
3. Uzorkovanje mleka svih jedinki u ogledu svakog meseca.
4. Određivanje broja somatskih ćelija (SCC) u uzorcima mleka.
5. Određivanje količine mleka i ispitivanje sastava mleka (sadržaj proteina i mlečne masti) u uzorcima ispitivanih krava.
6. Amplifikacija ciljne sekvence LTF gena PCR metodom.
7. Digestija dobijenih amplikona (PCR produkata) enzimom *EcoRI* (RFLP metoda).
8. Ispitivanje polimorfizma LTF gena krava u ogledu analizom dobijenih produkata digestije amplikona.
9. Analiza povezanosti utvrđenih polimorfizama LTF gena sa praćenim parametrima zdravstvenog stanja mlečne žlezde, kvaliteta mleka, i mlečnosti ispitivanih krava.
10. Statistička obrada podataka

## **4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA**

### **4.1. Materijal**

#### **4.1.1. Ogledne životinje**

Ogled je obuhvatao 100 mlečnih Holštajn-Frizijskih (HF) krava izabranih slučajnim uzorkom na farmama AD Napredak Stara Pazova. Deset krava je u toku ogleda isključeno zbog različitih poremećaja zdravstvenog stanja koja nisu bila u direktnoj vezi sa ogledom. U okviru grupe bilo je 23 krave (25,26%) u prvoj laktaciji, 22 krave (24,44%) u drugoj laktaciji, 20 krava (22,22%) u trećoj laktaciji i 25 krava (27,78%) u četvroj laktaciji. Ogled je izveden u periodu od januara 2012. do juna 2014. godine podeljen u dva dela, prvi deo se odnosio na period januar 2012. do novembra 2013., i obuhvatao je 53 krave (6 isključeno) a drugi na period od decembra 2013. do juna 2014. i obuhvatao je 47 krava (4 isključeno). Sve krave su držane u istim zoohigijenskim i zotehničkim uslovima slobodnog sistema gajenja. Takođe, sve krave su dobijale približno sličan obrok u zavisnosti od proizvodne kategorije. Mužene su dva puta dnevno, mašinski.

## **4.2. METODE ISTRAŽIVANJA**

### **4.2.1. Uzimanje uzoraka mleka**

Uzorkovanje mleka radi brojanja somatskih ćelija vršeno je jednom mesečno od svake krave tokom perioda standardne laktacije (305 dana). Mleko krava u ogledu uzimano je iz svake četvrti vimena u količini od 5 do 10 ml i čuvano u sterilnim epruvetama za jednokratnu upotrebu. Pre uzimanja uzoraka, vime je obrisano krpom, dobro natopljenom i iscedenom u dezinficijesu. Čišćenje i dezinfekcija vrhova sisa i otvora sisnog kanala vršena je tako da je palcem i savijenim kažiprstom leve ruke prihvatana sisa blizu vrha, stezana i povlačena da bi isteklo nekoliko kapi mleka u tankom mlazu, a zatim je vrh sise brisan sa tamponom vate, natopljenim 70% alkoholom. Dezinfekcija je vršena metodom "ka sebi" dok je uzimanje uzorka vršeno metodom "od sebe". Epruvete

su postavljene gotovo u horizontalni položaj i iz svake četvrti izmuzano je nekoliko mililitara mleka. Uzorci mleka su u ručnom frižideru dopremani u laboratoriju.

#### **4.2.2. Uzorkovanje mleka za ispitivanje kvaliteta**

Pribor za uzorkovanje mleka čine neprozirne plastične posude proizvedene od polipropilena sa gumenim čepom na vrhu. Posude moraju biti čiste i suve kako ne bi uticale na ispravnost samog uzorka. Uzorkovanje je vršeno jednom mesečno u periodu od 4. do 6. dana u mesecu zajedno sa uzorkovanjem mleka za citološki pregled. Uziman je grupni uzorak od svake jedinke u ogledu (iz sve četiri četvrti). Pri tom je vršeno sanitarno pranje vimena i dezinfekcija vrha sisne papile maramicama natopljenim 70% alkoholom.

#### **4.2.3. Uzorkovanje krvi za molekularno-genetička istraživanja**

Uzorkovanje 10 ml pune krvi za ekstrakciju DNK vršeno je iz *Vena coccigea media* (repne vene) jednokratno u epruvete koje sadrže kalijum-etilendiaminosirćetnu kiselinu ( $K_2$ -EDTA) kao antikoagulans. Sve epruvete su prethodno obeležene brojevima krava pomoću permanentnog markera. Krv je transportovana do laboratorije u ručnom frižideru na ledu.

#### **4.2.4. Sastav i ocena kvaliteta mleka**

Pod sirovim mlekom, (Sl. Glasnik Republike Srbije 21/09), podrazumeva se mleko dobijeno redovnom, neprekidnom i potpunom mužom zdravih, pravilno hranjenih muznih životinja, najkasnije 30 dana pre partusa i najranije osam dana posle partusa, koje nije zagrevano na temperaturi višoj od 40° C i kome ništa nije dodato niti oduzeto. Sirovo mleko treba da sadrži najmanje 3,2% mlečne masti, da ima najmanje 3,0% proteina, najmanje 8,5% suve materije bez masti, da je gustine od 1,028-1,034 g/cm<sup>3</sup> pri temperaturi od 20° C, pH od 6,5-6,7, kiselost 6,6-6,8° SH, ima tačku mržnjenja koja nije viša od -0,520° C i da je rezultat alkoholne probe sa 72% etil alkoholom negativan.

#### **4.2.4.1. Određivanje sadržaja masti i proteina u mleku**

Sadržaj masti u mleku može se odrediti na više načina. Za ispitivanje velikog broja uzoraka mleka sa farmi koriste se instrumentalne metode koje su usaglašene sa standardnim metodama. U laboratoriji za mleko Departmana za stočarstvo Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, u kojoj su rađena ispitivanja hemijskog sastava mleka uzoraka krava iz ogleda, analize se vrše na automatskom analajzeru Milcoscan (Foss, Danska) koji funkcioniše na principu merenja apsorpcije infracrvenog zračenja srednje dužine pri talasnoj dužini koja odgovara mlečnoj masti i proteinima.

#### **4.2.5. Određivanje ukupne mlečnosti krava**

Ukupna mlečnost krava izračunava se na osnovu dobijenih vrednosti mesečnih kontrola koje se saberu, podele sa brojem meseci kontrole (7) i dobijena vrednost pomnoži sa 305 (broj dana standardne laktacije).

Ukupna mlečnost (Um)= Zbir kontrolnih vrednosti \*30

7

#### **4.2.6. Određivanje broja somatskih ćelija u mleku**

##### **4.2.6.1. Pravljenje mikroskopskog preparata**

Broj somatskih ćelija ispitivan je svetlosnom mikroskopijom. Od svih uzoraka mleka pripremljeni su preparati na sledeći način: na mikroskopsku pločicu preneto je 0,01 ml mleka i razliveno na površinu od 1 cm<sup>2</sup>. Da bi se ovo postiglo korišćeni su odgovarajući kartoni ispod mikroskopske pločice, sa ucrtanim kvadratom veličine 1 cm<sup>2</sup>. Kada je preparat osušen (najmanje 24h) vršeno je obezmaščivanje 5 minuta ksilolom, zatim sušenje i fiksiranje etanolom u trajanju od 5 minuta, i nakon sušenja obavlja se bojenje ranije pripremljenom bojom.

#### **4.2.6.2. Priprema boje za somatske ćelije**

- 375 ml etil alkohola, 130 ml destilovane vode i 3 g metilenskog plavog se kuva dok se boja potpuno ne rastvori, a zatim se filtrira kroz filter papir. U rastvor se zatim dodaju dva rastvora, A i B:

- Rastvor A, 10 g bazičnog fuksina se rastvori u 100 ml etilalkohola i pre upotrebe se filtrira kroz filter papir;

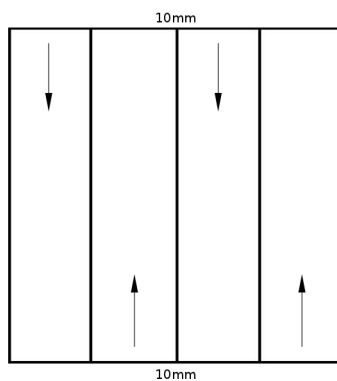
- Rastvor B, 10 ml anilina.

Svi rastvori se pomešaju, blago zagreju, a zatim im se doda 25 ml 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  i 300 ml vrele destilovane vode, ponovo zagreje 1 minut i i na kraju filtrira. Ovako pripremljena boja koristi se za citološko bojenje ćelija iz mleka.

#### **4.2.6.3. Brojanje somatskih ćelija**

Pomoću mikroskopa broje se ćelije na preparatu, samo u poljima koja su ispunjena mlekom. Broje se samo ćelije sa jedrom. Uobičajena veličina ćelija je  $8\mu\text{m}$  ili veće. Ne broje se ćelije koje su manje od  $4\mu\text{m}$ . Ne broje se potpuno raspale ćelije, kojima je jedro potpuno dezintegrisano. Ovakvi fragmenti mogu se uzeti u obzir ako je više od 50% jedarnog materijala vidljivo. Čelijske nakupine ili slepljene ćelije se broje kao jedna ćelija, izuzev ako jedarne jedinice nisu jasno izdvojene.

Prilikom brojanja, na preparatu se polazi od gornjeg levog ugla, obavezno se zanemari, tj preskoči ivica preparata od barem jednog vidnog polja, a zatim se vrši brojanje čelijskih elemenata čitavom dužinom preparata, do krajnje donje ivice. Zabeleži se izbrojana vrednost ćelija duž vertikale, zatim se postupak ponavlja još tri puta, odnosno dok ne dobijemo zbir sa 4 segmenta (tj. 4 vertikale preparata). To se ostvaruje pomeranjem vidnog polja tj. objektiva mikroskopa udesno pa se sledeća vertikala broji odozdo sve do gornje ivice preparata. Kada dobijemo ukupan broj ćelija duž četiri vertikale, dobijene vrednosti se sabiraju i to je  $N_t$  vrednost.



Slika 3. Princip brojanja somatskih ćelija na preparatu (preuzeto A. Kos, specijalistički rad, 2012)

Brojanje ćelija se vrši u segmentima preparata pri čemu je širina segmenta jednaka prečniku vidnog polja (R) a dužina jednaka dužini preparata (10 mm). Broji se najmanje 4 takva segmenta. Izračuna se srednja vrednost broja somatskih ćelija u jednom segmentu ( $N_t/N_b$ ). Srednja vrednost broja somatskih ćelija po jednom segmentu pomnoži se sa Radnim faktorom. Radni faktor se izračunava po sledećoj formuli:

$$RF = W_s/D_f \times V_m$$

gde je:

$W_s$  - širina preparata (10mm)

$D_f$  - prečnik vidnog polja mikroskopa (R)

$V_m$  – zapremina mleka upotrebljena za pravljenje preparata

Prema ovom obrascu, broj somatskih ćelija se određuje po sledećoj formuli:

$$N = RF \times (N_t/N_b)$$

Ili:

$$N = W_s \times N_t / D_f \times N_b \times V_m$$

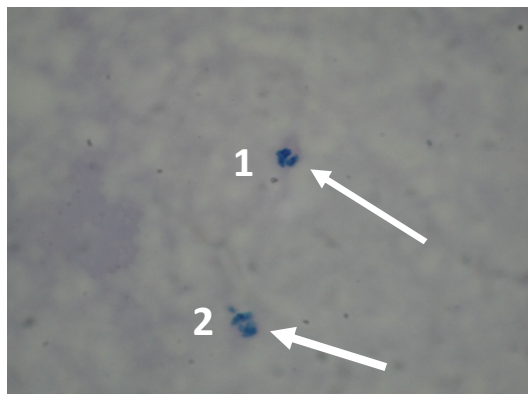
gde je:

$W_s$  – širina preparata (10 mm)

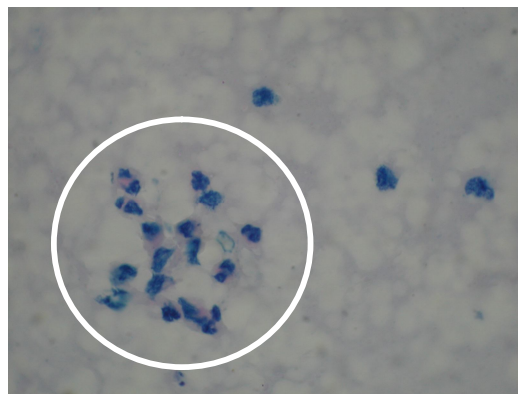
$N_t$  – ukupan broj izbrojanih somatskih ćelija

$D_f$  - prečnik vidnog polja mikroskopa

$V_m$  – zapremina uzorka (0,01 ml)



Slika. 4. Neutrofilni granulocit (1), polimorfonuklearni granulocit u razgradnji (2)



Slika 5. Nakupine ćelija-polimorfonulearni granulociti i epitelne ćelije

#### 4.2.7. Ekstrakcija DNK iz krvi

Ekstrakcija DNK vršena je na osnovu protokola proizvođača Kapa-Biosystem. U pripremljeno vodeno kupatilo, podešeno na 75°C, postavljaju se ependorf® epruvete sa 15 µL 10x KAPA Express Extract Buffer-a i 285 µl vode. Iz svake epruvete sa krvlju uziman je uzorak krvi pomoću sterilnog brisa. Nakon toga u 300 µl pripremljenog pufera potopan je bris i epruvete su zatvarane. Kako bi se uzorak što bolje homogenizovao u samom rastvoru pufera svaka epruveta je dobro promešana na električnoj mešalici. Ependorf epruvete su zatim postavljane u vodeno kupatilo 20 minuta na 75°C, a nakon toga menjan je temperaturni režim i temperatura povećana na 95°C u trajanju od 5 minuta. Nakon digestije u vodenom kupatilu uzorci su ponovo promešani na električnoj mešalici. Kako bi se odvojio supernatant u kom se nalazi ekstrahovana DNK uzorci su centrifugovani 1 minut na 1300 obrtaja/minuti. Pomoću automatske pipete uzimali smo 50 µl izolata prebacivali u nove ependorf epruvete zapremine 1,5 ml u kojima je predhodno pripremljen 2 % rastvor stabilizujućeg TE pufera. Ovako razređenu DNK deponovali smo u zamrzivač i čuvali na -20 °C.



#### 4.2.7. PCR amplifikacija fragmenta laktoferin gena

Za umnožavanje praćenog fragmenta laktoferin gena (amplikona) dužine 301 baznih parova korišćen je par prajmera: 5'-GCC TCA TGA CAA CTC CCA CAC-3' 5'-CAG GTT GAC ACA TCG GTT GAC -3'. (Woydac-Maksimiec i sar. 2006). Smeša za PCR reakciju je pripremana u minutubama u zapremini od 25 µl i sastojala se od 12,5 µL KAPA 2G Robust HotStart ReadyMix (Kapa Biosystems), po 1.25 µl svakog prajmera i 10 µl izolovane DNK. PCR uređaj u kom su obrađeni uzorci je Multi-Gene Gradient (Labnet International Inc.). Temperaturni protokol činila je inicijalna denaturacija na 95 °C u trajanju od 2 minuta, zatim kroz 40 ciklusa smenjivali su se procesi denaturacije na 95 °C u trajanju od 15 sekundi, hibridizacije prajmera na 60 °C u trajanju od 15 sekundi i elongacija prajmera u trajanju od 15 sekundi na 72 °C. Finalna elongacija odvija se na 72 °C poslednjih 8 minuta.

#### 4.2.8. Polimorfizam u dužini restrikcionih fragmenata laktoferin gena (RFLP-analiza)

Identifikacija laktoferin (LTF) genotipa izvršena je RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*-polimorfizam u dužini restrikcionih fragmenata) metodom nakon digestije PCR produkata pomoću restrikcionog enzima. RFLP analizom otkrivaju se aleli koji se razlikuju po prisustvu, odnosno odsustvu restrikcionih mesta za enzime (Botstein i sar., 1980)

##### 4.2.8.1. Protokol za RFLP analizu

Digestija PCR produkata vršena je prema preporuci proizvođača restrikcionog enzima *EcoRI* (Fermentas, USA) kao 30 µl reakcija koju čine 17 µl dejonizovane vode, 2 µL green bufer fast enzim<sup>®</sup>, 1 µl *EcoRI* (5U/ µL) i 10 µl PCR produkta. Reakcija se izvodi na temperaturi od 37 °C u termostatu u trajanju od 20 minuta a stopiranje restrikcionog enzima izvršeno je na temperaturi od 80 °C u trajanju od 5 minuta.

Digestovani fragmenati su obrađeni elektroforetski u 2 % agaroznom gelu (Sigma-Aldrich, Nemačka) sa TBE buferom u trajanju od 60 minuta. Vizuelizacija dobijenih

fragmenata izvršena je na UV lampi nakon potapanja gela u etidijum-bromid. Dužina fragmenata analizirana je primenom komercijalnog O'RangeRuler™ 50bp i 100 bp DNA Ladder-a.

## 5. REZULTATI

Ogled je obuhvatao 90 mlečnih Holštajn-Frizijskih (HF) krava izabranih slučajnim uzorkom na farmama AD Napredak u Staroj Pazovi. Krave su bile podeljene u 4 grupe pa je u prvoj bilo je 23 krave (25,26%) u prvoj laktaciji, u drugoj 22 krave (24,44%) u drugoj laktaciji, u trećoj 20 krava (22,22%) u trećoj laktaciji i u četvrtoj 25 krava (27,78%) u četvrtoj laktaciji.

### 5.1. Distribucija genotipova

Nakon izolacije DNK iz krvi, tehnikom PCR-RFLP kod grla sa posmatranih farmi pronađeni su genotipovi AA i AB. Genotip BB nije ustanovljen. U zajedničkom uzorku od 90 krava, konstatovana je statistički vrlo značajno veća ( $\chi^2=40,894$ ;  $p<0,001$ ) zastupljenost genotipa AA (74 ili 82,22%) u odnosu na zastupljenost genotipa AB (16 ili 17,78%). Prema Hardy-Weinberg jednačini odnos genotipova AA, AB i BB se nalazi u ravnoteži ( $p=0,3547$ ). Distribucija A alela u posmatranoj populaciji bila 91,11% a B alela 8,89%.

$$H_w=p^2+2pq+q^2=1$$

Tabela 1. Raspored genotipova prema Hardy-Weinberg jednačini ravnoteže populacije

| Genotip | Broj jedinki | Očekivani broj jedinki |
|---------|--------------|------------------------|
| AA      | 74           | 74,71                  |
| AB      | 16           | 14,58                  |
| BB      | 0            | 0,71                   |

Tabela 2. Osnovni statistički pokazatelji za posmatrane parametre kod ispitivanih krava

| Red. br. krave | Br. krave | Genotip | Parametar       | Br. merenja | Aritmetička sredina ( $\bar{x}$ ) | Medijana   | Minimum   | Maksimum   | Koeficijent varijacije ( $c_v$ ) u % |
|----------------|-----------|---------|-----------------|-------------|-----------------------------------|------------|-----------|------------|--------------------------------------|
| 1.             | 215234    | AA      | Proteini        | 6           | 3,36                              | 3,26       | 3,18      | 3,71       | 6,50                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,90                              | 3,89       | 2,89      | 4,81       | 16,16                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 23,67                             | 23,50      | 20,00     | 28,00      | 10,91                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 4           | 2344700,00                        | 2307000,00 | 595200,00 | 4169600,00 | 70,20                                |
| 2.             | 215114    | AA      | Proteini        | 6           | 3,30                              | 3,26       | 3,00      | 3,85       | 9,03                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,78                              | 3,88       | 3,39      | 4,01       | 6,26                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 33,67                             | 34,00      | 28,00     | 37,00      | 9,33                                 |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 355366,67                         | 262400,00  | 41600,00  | 1028800,00 | 109,64                               |
| 3.             | 215280    | AA      | Proteini        | 6           | 3,32                              | 3,20       | 3,12      | 4,00       | 10,17                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,59                              | 3,60       | 3,20      | 3,91       | 6,32                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 34,83                             | 35,50      | 30,00     | 37,00      | 7,13                                 |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 4           | 424275,00                         | 364050,00  | 46400,00  | 922600,00  | 103,06                               |
| 4.             | 214593    | AA      | Proteini        | 6           | 3,35                              | 3,31       | 3,12      | 3,71       | 6,27                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,64                              | 3,62       | 3,22      | 4,00       | 8,49                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 36,33                             | 36,00      | 35,00     | 40,00      | 5,12                                 |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 4           | 402200,00                         | 431200,00  | 163200,00 | 583200,00  | 43,69                                |
| 5.             | 213634    | AA      | Proteini        | 6           | 3,34                              | 3,21       | 3,13      | 3,85       | 8,16                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,57                              | 3,57       | 3,24      | 3,99       | 8,18                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 41,67                             | 40,50      | 33,00     | 49,00      | 14,37                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 3           | 846133,33                         | 867200,00  | 136000,00 | 1535200,00 | 82,71                                |
| 6.             | 213124    | AA      | Proteini        | 6           | 3,55                              | 3,76       | 2,75      | 3,90       | 12,89                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,42                              | 3,41       | 3,20      | 3,63       | 4,34                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 49,17                             | 51,00      | 38,00     | 54,00      | 11,96                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 3           | 244000,00                         | 137600,00  | 19200,00  | 575200,00  | 120,03                               |
| 7.             | 212282    | AA      | Proteini        | 6           | 3,18                              | 3,16       | 3,00      | 3,53       | 6,21                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,47                              | 3,60       | 2,54      | 3,88       | 13,57                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 31,67                             | 34,00      | 23,00     | 38,00      | 17,49                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 257525,00                         | 243800,00  | 25600,00  | 684800,00  | 92,19                                |
| 8.             | 215421    | AB      | Proteini        | 6           | 3,18                              | 3,17       | 3,01      | 3,39       | 4,36                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,58                              | 3,48       | 3,22      | 4,16       | 9,93                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 19,50                             | 16,50      | 14,00     | 28,00      | 34,29                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 318746,67                         | 221600,00  | 66130,00  | 654350,00  | 77,85                                |
| 9.             | 215398    | AA      | Proteini        | 6           | 3,18                              | 3,17       | 3,01      | 3,39       | 4,36                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,58                              | 3,48       | 3,22      | 4,16       | 9,93                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 19,50                             | 16,50      | 14,00     | 28,00      | 34,29                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 318746,67                         | 221600,00  | 66130,00  | 654350,00  | 77,85                                |

Tabela 2. Osnovni statistički pokazatelji za posmatrane parametre kod ispitivanih krava (nastavak)

| Red. br. krave | Br. krave | Genotip | Parametar       | Br. merenja | Aritmetička sredina ( $\bar{x}$ ) | Medijana  | Minimum  | Maksimum   | Koeficijent varijacije ( $c_v$ ) u % |
|----------------|-----------|---------|-----------------|-------------|-----------------------------------|-----------|----------|------------|--------------------------------------|
| 10.            | 215444    | AB      | Proteini        | 6           | 3,17                              | 3,16      | 3,00     | 3,40       | 4,59                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,42                              | 3,39      | 3,19     | 3,62       | 4,90                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 28,00                             | 30,00     | 22,00    | 32,00      | 15,49                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 487306,67                         | 518800,00 | 61440,00 | 870400,00  | 59,28                                |
| 11.            | 215201    | AB      | Proteini        | 6           | 3,18                              | 3,16      | 3,01     | 3,51       | 5,56                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,57                              | 3,54      | 3,21     | 4,01       | 7,23                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 35,00                             | 34,00     | 27,00    | 46,00      | 24,64                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 5           | 262400,00                         | 65600,00  | 30400,00 | 1038400,00 | 165,96                               |
| 12.            | 214265    | AB      | Proteini        | 6           | 3,33                              | 3,16      | 2,77     | 3,99       | 14,83                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,76                              | 3,84      | 2,95     | 4,29       | 13,60                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 37,83                             | 37,50     | 35,00    | 42,00      | 7,37                                 |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 5           | 334080,00                         | 40000,00  | 17600,00 | 1071200,00 | 139,29                               |
| 13.            | 215424    | AB      | Proteini        | 6           | 3,28                              | 3,23      | 3,03     | 3,60       | 6,85                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,65                              | 3,60      | 3,43     | 4,00       | 5,60                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 29,67                             | 30,00     | 26,00    | 33,00      | 10,59                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 5           | 1005813,33                        | 433600,00 | 24000,00 | 3908266,67 | 162,82                               |
| 14.            | 215413    | AB      | Proteini        | 6           | 3,08                              | 3,11      | 2,88     | 3,20       | 3,92                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,59                              | 3,65      | 2,95     | 4,22       | 13,66                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 30,50                             | 31,50     | 23,00    | 35,00      | 13,24                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 5           | 153920,00                         | 108800,00 | 33600,00 | 411200,00  | 97,88                                |
| 15.            | 214456    | AB      | Proteini        | 6           | 3,31                              | 3,29      | 3,09     | 3,60       | 5,75                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,43                              | 3,43      | 3,29     | 3,60       | 3,42                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 40,83                             | 40,50     | 35,00    | 48,00      | 12,14                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 4           | 122350,00                         | 28800,00  | 14400,00 | 417400,00  | 160,92                               |
| 16.            | 214454    | AA      | Proteini        | 6           | 3,16                              | 3,17      | 2,75     | 3,60       | 8,58                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 4,07                              | 3,91      | 3,50     | 4,80       | 14,13                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 42,33                             | 41,00     | 37,00    | 49,00      | 10,42                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 5           | 204680,00                         | 145600,00 | 17600,00 | 480000,00  | 90,02                                |
| 17.            | 214512    | AA      | Proteini        | 6           | 3,23                              | 3,18      | 3,09     | 3,60       | 5,85                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,56                              | 3,59      | 3,23     | 3,80       | 5,29                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 40,33                             | 41,00     | 37,00    | 42,00      | 5,12                                 |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 5           | 468630,00                         | 366400,00 | 35150,00 | 980800,00  | 82,24                                |
| 18.            | 214581    | AB      | Proteini        | 6           | 3,46                              | 3,42      | 3,08     | 3,99       | 11,11                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,89                              | 3,71      | 3,50     | 4,66       | 11,61                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 29,83                             | 29,50     | 22,00    | 40,00      | 22,07                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 4           | 111560,00                         | 121520,00 | 32000,00 | 171200,00  | 61,48                                |

Tabela 2. Osnovni statistički pokazatelji za posmatrane parametre kod ispitivanih krava (nastavak)

| Red. br. krave | Br. krave | Genotip | Parametar       | Br. merenja | Aritmetička sredina ( $\bar{x}$ ) | Medijana   | Minimum   | Maksimum   | Koeficijent varijacije ( $c_v$ ) u % |
|----------------|-----------|---------|-----------------|-------------|-----------------------------------|------------|-----------|------------|--------------------------------------|
| 19.            | 214442    | AA      | Proteini        | 6           | 3,25                              | 3,29       | 2,85      | 3,50       | 7,90                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,56                              | 3,50       | 3,07      | 4,47       | 14,26                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 43,17                             | 42,50      | 36,00     | 50,00      | 14,08                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 5           | 499523,33                         | 516266,67  | 75200,00  | 955800,00  | 72,46                                |
| 20.            | 213456    | AA      | Proteini        | 6           | 3,39                              | 3,47       | 3,05      | 3,60       | 6,97                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,76                              | 3,76       | 3,13      | 4,84       | 16,74                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 35,00                             | 34,50      | 24,00     | 48,00      | 25,30                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 5           | 157226,67                         | 129600,00  | 102400,00 | 245333,33  | 41,01                                |
| 21.            | 213889    | AA      | Proteini        | 6           | 3,20                              | 3,11       | 2,71      | 3,81       | 11,75                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,78                              | 3,69       | 3,21      | 4,60       | 12,61                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 42,00                             | 45,00      | 30,00     | 50,00      | 17,75                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 225933,33                         | 164800,00  | 62800,00  | 438400,00  | 65,52                                |
| 22.            | 212844    | AA      | Proteini        | 6           | 3,18                              | 3,08       | 2,71      | 3,81       | 12,01                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,67                              | 3,59       | 3,02      | 4,60       | 15,57                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 43,00                             | 45,00      | 36,00     | 50,00      | 13,32                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 1277633,33                        | 1327700,00 | 566000,00 | 1962800,00 | 38,73                                |
| 23.            | 213593    | AA      | Proteini        | 6           | 3,24                              | 3,27       | 2,73      | 3,81       | 11,78                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,95                              | 3,80       | 3,64      | 4,86       | 11,65                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 33,17                             | 32,00      | 26,00     | 42,00      | 20,22                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 93608,33                          | 91200,00   | 33600,00  | 182400,00  | 55,65                                |
| 24.            | 212855    | AA      | Proteini        | 6           | 3,42                              | 3,36       | 2,99      | 3,87       | 9,91                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,59                              | 3,34       | 3,01      | 4,81       | 19,06                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 33,33                             | 34,50      | 28,00     | 36,00      | 8,83                                 |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 140141,67                         | 150400,00  | 22400,00  | 211050,00  | 45,61                                |
| 25.            | 213113    | AA      | Proteini        | 6           | 3,41                              | 3,35       | 3,12      | 3,91       | 8,49                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,63                              | 3,64       | 3,21      | 3,92       | 7,21                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 42,17                             | 41,00      | 34,00     | 50,00      | 13,37                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 147808,33                         | 93625,00   | 34800,00  | 517600,00  | 124,34                               |
| 26.            | 212748    | AA      | Proteini        | 6           | 3,45                              | 3,28       | 3,12      | 3,99       | 10,93                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,58                              | 3,62       | 3,10      | 3,98       | 10,06                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 38,67                             | 38,00      | 36,00     | 44,00      | 7,96                                 |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 5           | 737680,00                         | 718400,00  | 184000,00 | 1556000,00 | 77,80                                |
| 27.            | 213226    | AA      | Proteini        | 6           | 3,20                              | 3,11       | 2,88      | 3,81       | 10,19                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,58                              | 3,73       | 2,70      | 4,32       | 17,03                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 38,50                             | 38,00      | 33,00     | 44,00      | 9,68                                 |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 4           | 95150,00                          | 70400,00   | 28800,00  | 211000,00  | 87,32                                |

Tabela 2. Osnovni statistički pokazatelji za posmatrane parametre kod ispitivanih krava (nastavak)

| Red. br. krave | Br. krave | Genotip | Parametar       | Br. merenja | Aritmetička sredina ( $\bar{x}$ ) | Medijana   | Minimum   | Maksimum   | Koeficijent varijacije ( $c_v$ ) u % |
|----------------|-----------|---------|-----------------|-------------|-----------------------------------|------------|-----------|------------|--------------------------------------|
| 28.            | 213088    | AA      | Proteini        | 6           | 3,23                              | 3,22       | 3,19      | 3,31       | 1,38                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,54                              | 3,60       | 3,11      | 3,92       | 7,99                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 38,67                             | 42,00      | 25,00     | 45,00      | 20,28                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 5           | 743820,00                         | 441900,00  | 17600,00  | 2120000,00 | 116,49                               |
| 29.            | 214303    | AA      | Proteini        | 6           | 3,36                              | 3,22       | 2,99      | 3,89       | 11,98                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,69                              | 3,67       | 3,43      | 4,07       | 5,84                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 39,67                             | 39,50      | 27,00     | 52,00      | 20,34                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 5           | 29120,00                          | 36800,00   | 16000,00  | 38400,00   | 41,19                                |
| 30.            | 214209    | AA      | Proteini        | 6           | 3,14                              | 3,05       | 2,83      | 3,69       | 9,43                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,52                              | 3,56       | 3,09      | 3,85       | 7,01                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 33,33                             | 35,50      | 23,00     | 40,00      | 21,77                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 1618844,44                        | 1704000,00 | 963200,00 | 2000000,00 | 27,44                                |
| 31.            | 214486    | AB      | Proteini        | 6           | 3,18                              | 3,08       | 2,99      | 3,60       | 7,79                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,47                              | 3,51       | 3,11      | 3,63       | 5,42                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 38,00                             | 37,50      | 28,00     | 46,00      | 20,18                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 1273630,56                        | 470325,00  | 19000,00  | 6008000,00 | 183,17                               |
| 32.            | 213741    | AB      | Proteini        | 6           | 3,05                              | 3,00       | 2,94      | 3,24       | 3,61                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,39                              | 3,42       | 2,94      | 3,75       | 8,75                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 38,50                             | 39,50      | 28,00     | 51,00      | 24,19                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 5           | 664040,00                         | 584800,00  | 296000,00 | 1387200,00 | 67,00                                |
| 33.            | 213541    | AA      | Proteini        | 6           | 3,06                              | 3,08       | 2,88      | 3,19       | 4,23                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,56                              | 3,57       | 2,98      | 3,99       | 9,42                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 41,83                             | 41,00      | 33,00     | 55,00      | 19,97                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 1135983,33                        | 1207200,00 | 284700,00 | 2020800,00 | 57,68                                |
| 34.            | 214049    | AB      | Proteini        | 6           | 3,20                              | 3,21       | 2,84      | 3,71       | 9,17                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,66                              | 3,66       | 3,13      | 4,48       | 13,30                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 39,00                             | 40,00      | 28,00     | 46,00      | 15,47                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 1875100,00                        | 641300,00  | 44800,00  | 5148800,00 | 125,92                               |
| 35.            | 213299    | AB      | Proteini        | 6           | 3,19                              | 3,22       | 2,70      | 3,89       | 12,89                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,56                              | 3,67       | 3,17      | 3,85       | 8,78                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 35,83                             | 37,50      | 25,00     | 47,00      | 24,80                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 403800,00                         | 193600,00  | 23600,00  | 1379200,00 | 131,49                               |
| 36.            | 212756    | AA      | Proteini        | 6           | 3,17                              | 3,12       | 2,69      | 3,81       | 12,28                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,25                              | 3,32       | 2,01      | 4,13       | 21,73                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 38,83                             | 39,00      | 30,00     | 45,00      | 13,86                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 969700,00                         | 948000,00  | 670400,00 | 1363000,00 | 23,70                                |

Tabela 2. Osnovni statistički pokazatelji za posmatrane parametre kod ispitivanih krava (nastavak)

| Red. br. krave | Br. krave | Genotip | Parametar       | Br. merenja | Aritmetička sredina ( $\bar{x}$ ) | Medijana   | Minimum   | Maksimum   | Koeficijent varijacije ( $c_v$ ) u % |
|----------------|-----------|---------|-----------------|-------------|-----------------------------------|------------|-----------|------------|--------------------------------------|
| 37.            | 212784    | AA      | Proteini        | 6           | 3,27                              | 3,22       | 3,11      | 3,62       | 5,66                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,40                              | 3,41       | 3,14      | 3,60       | 5,93                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 35,83                             | 34,50      | 29,00     | 43,00      | 15,53                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 997688,89                         | 775200,00  | 300800,00 | 2104000,00 | 64,29                                |
| 38.            | 212655    | AB      | Proteini        | 6           | 3,20                              | 3,20       | 2,96      | 3,50       | 5,39                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,50                              | 3,59       | 3,24      | 3,60       | 4,28                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 29,00                             | 30,00      | 18,00     | 36,00      | 22,13                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 5           | 1678421,60                        | 1030600,00 | 22400,00  | 5132808,00 | 119,38                               |
| 39.            | 215511    | AA      | Proteini        | 6           | 3,38                              | 3,38       | 3,22      | 3,56       | 3,81                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,79                              | 3,82       | 3,36      | 4,01       | 5,93                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 33,17                             | 33,50      | 26,00     | 39,00      | 16,56                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 894658,33                         | 517200,00  | 244800,00 | 2147200,00 | 84,97                                |
| 40.            | 215574    | AA      | Proteini        | 6           | 3,28                              | 3,27       | 2,99      | 3,56       | 6,59                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,61                              | 3,78       | 2,66      | 3,91       | 13,06                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 37,83                             | 38,50      | 32,00     | 43,00      | 12,67                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 140577,78                         | 31200,00   | 17600,00  | 663200,00  | 182,76                               |
| 41.            | 215549    | AA      | Proteini        | 6           | 3,38                              | 3,49       | 3,00      | 3,60       | 6,88                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,71                              | 3,85       | 3,00      | 3,91       | 9,48                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 38,17                             | 38,00      | 32,00     | 43,00      | 9,86                                 |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 853250,00                         | 948550,00  | 33600,00  | 1609600,00 | 81,91                                |
| 42.            | 215463    | AA      | Proteini        | 6           | 3,45                              | 3,49       | 2,99      | 3,70       | 7,44                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,71                              | 3,86       | 3,15      | 3,92       | 7,98                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 33,17                             | 33,50      | 26,00     | 38,00      | 12,42                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 673200,00                         | 741600,00  | 27200,00  | 1595200,00 | 82,36                                |
| 43.            | 215486    | AA      | Proteini        | 6           | 3,14                              | 3,11       | 2,90      | 3,46       | 6,02                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,61                              | 3,87       | 2,90      | 4,04       | 13,29                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 27,83                             | 29,00      | 20,00     | 33,00      | 17,95                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 5           | 80340,00                          | 34850,00   | 14400,00  | 198850,00  | 102,50                               |
| 44.            | 214457    | AA      | Proteini        | 6           | 3,42                              | 3,34       | 3,14      | 3,87       | 7,92                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,63                              | 3,63       | 3,24      | 4,12       | 9,70                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 32,50                             | 34,50      | 28,00     | 35,00      | 10,79                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 5           | 325950,00                         | 364800,00  | 30400,00  | 829600,00  | 100,13                               |
| 45.            | 214245    | AA      | Proteini        | 5           | 3,15                              | 3,17       | 2,98      | 3,26       | 3,37                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 5           | 3,61                              | 3,48       | 3,00      | 4,87       | 20,88                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 5           | 39,20                             | 40,00      | 22,00     | 50,00      | 26,66                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 4           | 222975,00                         | 165600,00  | 47900,00  | 512800,00  | 96,24                                |



Tabela 2. Osnovni statistički pokazatelji za posmatrane parametre kod ispitivanih krava (nastavak)

| Red. br. krave | Br. krave | Genotip | Parametar       | Br. merenja | Aritmetička sredina ( $\bar{x}$ ) | Medijana   | Minimum   | Maksimum    | Koeficijent varijacije ( $c_v$ ) u % |
|----------------|-----------|---------|-----------------|-------------|-----------------------------------|------------|-----------|-------------|--------------------------------------|
| 46.            | 213439    | AA      | Proteini        | 5           | 3,35                              | 3,38       | 2,98      | 3,60        | 7,10                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 5           | 3,31                              | 3,44       | 3,00      | 3,51        | 7,28                                 |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 5           | 38,00                             | 42,00      | 25,00     | 44,00       | 20,80                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 4           | 317772,50                         | 370400,00  | 35890,00  | 494400,00   | 63,03                                |
| 47.            | 0 95416   | AA      | Proteini        | 6           | 3,21                              | 3,19       | 2,66      | 3,67        | 11,34                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,17                              | 2,95       | 1,41      | 4,79        | 40,05                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 29,87                             | 30,35      | 23,30     | 35,30       | 16,81                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 293833,33                         | 198500,00  | 13000,00  | 926000,00   | 116,68                               |
| 48.            | 703955    | AA      | Proteini        | 6           | 3,23                              | 3,34       | 2,62      | 3,72        | 12,64                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 4,25                              | 4,32       | 2,74      | 5,50        | 27,86                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 33,48                             | 33,55      | 30,50     | 35,20       | 4,88                                 |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 462333,33                         | 89500,00   | 33000,00  | 2171000,00  | 182,77                               |
| 49.            | 524108    | AA      | Proteini        | 6           | 3,16                              | 3,22       | 2,72      | 3,46        | 9,78                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,99                              | 4,31       | 2,53      | 5,48        | 28,86                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 33,68                             | 34,50      | 30,50     | 36,10       | 7,47                                 |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 81666,67                          | 64500,00   | 44000,00  | 135000,00   | 51,27                                |
| 50.            | 837079    | AA      | Proteini        | 6           | 3,13                              | 3,00       | 2,84      | 3,57        | 9,92                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,94                              | 4,45       | 1,77      | 5,26        | 33,27                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 38,72                             | 40,60      | 30,00     | 46,40       | 16,75                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 247000,00                         | 143000,00  | 41000,00  | 646000,00   | 95,62                                |
| 51.            | 837088    | AA      | Proteini        | 6           | 3,28                              | 3,35       | 2,78      | 3,74        | 11,08                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,40                              | 3,53       | 1,57      | 5,08        | 33,51                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 35,03                             | 35,15      | 25,50     | 43,90       | 22,96                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 4059166,67                        | 1339500,00 | 143000,00 | 19330000,00 | 185,21                               |
| 52.            | 524008    | AA      | Proteini        | 6           | 3,76                              | 3,51       | 2,93      | 5,48        | 24,76                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,90                              | 3,29       | 1,05      | 8,46        | 63,38                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 19,20                             | 20,65      | 5,20      | 28,00       | 42,57                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 367000,00                         | 294000,00  | 42000,00  | 875000,00   | 98,85                                |
| 53.            | 524405    | AA      | Proteini        | 6           | 3,36                              | 3,50       | 2,49      | 3,85        | 15,45                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 4,92                              | 4,95       | 3,89      | 6,59        | 19,14                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 30,23                             | 31,30      | 21,50     | 35,60       | 16,68                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 200333,33                         | 158500,00  | 55000,00  | 408000,00   | 77,13                                |
| 54.            | 833098    | AA      | Proteini        | 6           | 3,15                              | 3,12       | 2,52      | 3,91        | 15,40                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 4,32                              | 4,27       | 2,21      | 5,81        | 29,91                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 31,23                             | 31,45      | 28,50     | 34,00       | 6,26                                 |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 81166,67                          | 58000,00   | 24000,00  | 165000,00   | 76,26                                |

Tabela 2. Osnovni statistički pokazatelji za posmatrane parametre kod ispitivanih krava (nastavak)

| Red. br. krave | Br. krave | Genotip | Parametar       | Br. merenja | Aritmetička sredina ( $\bar{x}$ ) | Medijana   | Minimum   | Maksimum   | Koeficijent varijacije ( $c_v$ ) u % |
|----------------|-----------|---------|-----------------|-------------|-----------------------------------|------------|-----------|------------|--------------------------------------|
| 55.            | 524300    | AB      | Proteini        | 6           | 3,38                              | 3,20       | 3,02      | 4,01       | 11,37                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,55                              | 3,12       | 1,88      | 6,28       | 43,25                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 28,75                             | 31,85      | 13,90     | 37,80      | 31,53                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 295333,33                         | 245000,00  | 38000,00  | 703000,00  | 86,03                                |
| 56.            | 524099    | AA      | Proteini        | 6           | 3,08                              | 3,19       | 2,47      | 3,30       | 9,95                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 4,48                              | 4,12       | 2,72      | 6,51       | 36,38                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 26,27                             | 25,70      | 21,90     | 29,70      | 11,60                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 119333,33                         | 94000,00   | 34000,00  | 232000,00  | 80,35                                |
| 57.            | 833071    | AA      | Proteini        | 6           | 3,21                              | 3,28       | 2,74      | 3,54       | 9,52                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 4,34                              | 4,39       | 3,05      | 5,22       | 16,49                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 25,88                             | 28,05      | 12,20     | 29,90      | 26,16                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 266000,00                         | 129000,00  | 65000,00  | 1010000,00 | 137,90                               |
| 58.            | 524083    | AA      | Proteini        | 7           | 3,13                              | 3,20       | 2,61      | 3,51       | 10,25                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 7           | 3,50                              | 3,72       | 0,96      | 6,06       | 46,94                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 7           | 36,51                             | 37,00      | 26,90     | 43,40      | 14,25                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 7           | 482142,86                         | 309000,00  | 24000,00  | 1637000,00 | 117,20                               |
| 59.            | 703739    | AA      | Proteini        | 7           | 3,36                              | 3,44       | 3,04      | 3,62       | 6,58                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 7           | 4,12                              | 3,79       | 2,47      | 6,52       | 38,08                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 7           | 31,71                             | 34,40      | 24,30     | 36,80      | 17,31                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 7           | 2391714,29                        | 1495000,00 | 118000,00 | 9304000,00 | 131,82                               |
| 60.            | 524219    | AA      | Proteini        | 6           | 2,92                              | 3,00       | 2,14      | 3,49       | 16,48                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 5,62                              | 4,90       | 3,00      | 11,64      | 55,89                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 34,28                             | 34,75      | 29,20     | 38,40      | 12,98                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 219500,00                         | 175000,00  | 33000,00  | 465000,00  | 83,46                                |
| 61.            | 524130    | AB      | Proteini        | 7           | 3,15                              | 2,98       | 2,82      | 3,78       | 11,46                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 7           | 3,91                              | 3,71       | 3,23      | 4,54       | 12,73                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 7           | 27,64                             | 29,30      | 14,50     | 36,10      | 26,23                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 7           | 280428,57                         | 69000,00   | 7000,00   | 1310000,00 | 170,06                               |
| 62.            | 524258    | AA      | Proteini        | 7           | 3,05                              | 2,95       | 2,70      | 3,94       | 13,55                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 7           | 4,00                              | 3,89       | 0,65      | 6,60       | 46,86                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 7           | 35,37                             | 38,70      | 28,00     | 40,60      | 16,10                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 7           | 442857,14                         | 265000,00  | 41000,00  | 1405000,00 | 113,92                               |
| 63.            | 703706    | AA      | Proteini        | 6           | 3,16                              | 3,23       | 2,45      | 3,72       | 13,56                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,99                              | 3,34       | 1,47      | 9,44       | 69,79                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 19,72                             | 19,10      | 14,10     | 28,20      | 24,05                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 412166,67                         | 434000,00  | 183000,00 | 633000,00  | 50,38                                |

Tabela 2. Osnovni statistički pokazatelji za posmatrane parametre kod ispitivanih krava (nastavak)

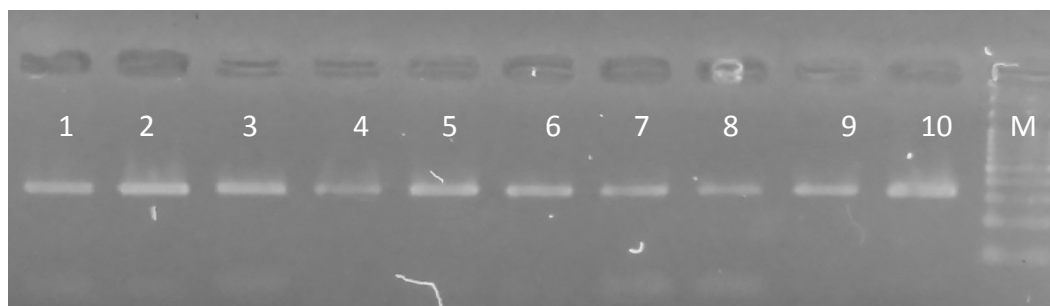
| Red. br. krave | Br. krave | Genotip | Parametar       | Br. merenja | Aritmetička sredina ( $\bar{x}$ ) | Medijana  | Minimum   | Maksimum   | Koeficijent varijacije ( $c_v$ ) u % |
|----------------|-----------|---------|-----------------|-------------|-----------------------------------|-----------|-----------|------------|--------------------------------------|
| 64.            | 703868    | AA      | Proteini        | 7           | 3,31                              | 3,26      | 3,07      | 3,73       | 6,13                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 7           | 5,64                              | 4,56      | 3,64      | 12,45      | 55,57                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 7           | 28,06                             | 27,70     | 21,60     | 34,70      | 20,19                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 7           | 350000,00                         | 204000,00 | 88000,00  | 1245000,00 | 114,66                               |
| 65.            | 833041    | AB      | Proteini        | 7           | 3,15                              | 3,23      | 2,69      | 3,47       | 9,83                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 7           | 4,56                              | 4,39      | 3,38      | 5,56       | 16,25                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 7           | 24,29                             | 24,20     | 14,60     | 33,60      | 23,40                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 7           | 445428,57                         | 204000,00 | 48000,00  | 1327000,00 | 108,19                               |
| 66.            | 837035    | AA      | Proteini        | 4           | 3,45                              | 3,48      | 2,60      | 4,22       | 25,71                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 4           | 4,63                              | 4,70      | 3,85      | 5,27       | 14,03                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 4           | 13,38                             | 13,20     | 10,50     | 16,60      | 19,31                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 4           | 285500,00                         | 293500,00 | 103000,00 | 452000,00  | 51,90                                |
| 67.            | 524018    | AA      | Proteini        | 7           | 3,01                              | 2,98      | 2,45      | 3,29       | 9,61                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 7           | 4,46                              | 3,58      | 3,11      | 9,77       | 53,34                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 7           | 27,43                             | 28,10     | 17,90     | 34,00      | 21,63                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 7           | 812857,14                         | 587000,00 | 125000,00 | 2276000,00 | 97,74                                |
| 68.            | 524173    | AA      | Proteini        | 6           | 3,32                              | 3,38      | 2,81      | 3,69       | 9,49                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,82                              | 4,05      | 2,43      | 4,61       | 21,61                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 29,48                             | 31,40     | 14,70     | 40,00      | 30,70                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 87833,33                          | 33500,00  | 8000,00   | 220000,00  | 113,65                               |
| 69.            | 524302    | AA      | Proteini        | 7           | 3,29                              | 3,46      | 2,80      | 3,60       | 10,53                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 7           | 3,87                              | 3,79      | 3,17      | 5,04       | 16,70                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 7           | 27,54                             | 24,30     | 23,40     | 42,10      | 24,60                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 7           | 990285,71                         | 118000,00 | 41000,00  | 4243000,00 | 158,71                               |
| 70.            | 669115    | AA      | Proteini        | 7           | 3,00                              | 2,99      | 2,78      | 3,33       | 6,89                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 7           | 3,58                              | 3,82      | 0,73      | 5,55       | 45,91                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 7           | 38,76                             | 39,00     | 35,80     | 41,20      | 4,89                                 |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 7           | 61857,14                          | 56000,00  | 21000,00  | 142000,00  | 63,26                                |
| 71.            | 524195    | AA      | Proteini        | 7           | 3,05                              | 3,05      | 2,14      | 3,63       | 16,55                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 7           | 4,58                              | 4,49      | 2,12      | 7,62       | 38,53                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 7           | 33,66                             | 33,80     | 29,40     | 37,80      | 9,40                                 |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 7           | 337428,57                         | 144000,00 | 22000,00  | 1719000,00 | 181,75                               |
| 72.            | 277525    | AA      | Proteini        | 6           | 3,26                              | 3,33      | 2,77      | 3,56       | 10,12                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 4,04                              | 4,08      | 1,91      | 6,37       | 36,61                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 30,92                             | 31,20     | 27,80     | 34,60      | 8,84                                 |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 881833,33                         | 341500,00 | 24000,00  | 2907000,00 | 131,59                               |

Tabela 2. Osnovni statistički pokazatelji za posmatrane parametre kod ispitivanih krava (nastavak)

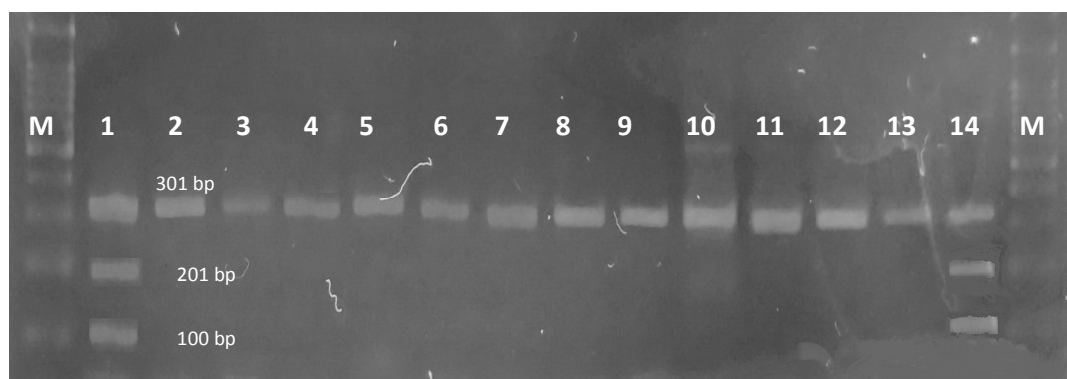
| Red. br. krave | Br. krave | Genotip | Parametar       | Br. merenja | Aritmetička sredina ( $\bar{x}$ ) | Medijana  | Minimum   | Maksimum   | Koeficijent varijacije ( $c_v$ ) u % |
|----------------|-----------|---------|-----------------|-------------|-----------------------------------|-----------|-----------|------------|--------------------------------------|
| 73.            | 703872    | AA      | Proteini        | 7           | 3,09                              | 3,27      | 2,55      | 3,36       | 9,96                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 7           | 4,04                              | 4,43      | 2,55      | 5,38       | 24,71                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 7           | 32,97                             | 34,00     | 28,80     | 37,60      | 9,31                                 |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 7           | 1088000,00                        | 86000,00  | 11000,00  | 6890000,00 | 235,44                               |
| 74.            | 833005    | AA      | Proteini        | 4           | 3,19                              | 3,09      | 2,88      | 3,69       | 11,53                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 4           | 5,25                              | 4,76      | 0,94      | 10,54      | 78,36                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 4           | 34,65                             | 34,50     | 31,60     | 38,00      | 8,45                                 |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 4           | 108750,00                         | 87500,00  | 45000,00  | 215000,00  | 69,42                                |
| 75.            | 833088    | AA      | Proteini        | 6           | 3,15                              | 3,28      | 2,61      | 3,37       | 9,25                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 4,77                              | 4,91      | 3,16      | 5,84       | 18,43                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 26,87                             | 27,40     | 23,60     | 28,60      | 6,54                                 |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 235500,00                         | 154500,00 | 101000,00 | 600000,00  | 80,13                                |
| 76.            | 833010    | AA      | Proteini        | 6           | 2,99                              | 3,02      | 2,48      | 3,49       | 14,40                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 4,93                              | 4,26      | 3,80      | 8,62       | 37,03                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 26,82                             | 29,50     | 14,40     | 31,70      | 24,27                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 156500,00                         | 69000,00  | 23000,00  | 633000,00  | 149,97                               |
| 77.            | 524412    | AA      | Proteini        | 5           | 3,17                              | 3,39      | 2,77      | 3,43       | 10,64                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 5           | 4,03                              | 3,87      | 2,20      | 6,90       | 43,49                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 5           | 25,78                             | 29,00     | 13,50     | 30,80      | 27,84                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 5           | 181200,00                         | 106000,00 | 32000,00  | 556000,00  | 119,45                               |
| 78.            | 833096    | AA      | Proteini        | 5           | 3,75                              | 3,63      | 3,34      | 4,63       | 13,57                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 5           | 3,22                              | 3,32      | 2,64      | 3,84       | 15,27                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 5           | 12,92                             | 12,50     | 9,60      | 15,70      | 18,26                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 5           | 740200,00                         | 256000,00 | 161000,00 | 2165000,00 | 114,90                               |
| 79.            | 703876    | AA      | Proteini        | 5           | 3,03                              | 3,02      | 2,83      | 3,18       | 4,35                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 5           | 3,62                              | 3,38      | 2,30      | 5,22       | 29,29                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 5           | 31,50                             | 34,00     | 26,40     | 35,10      | 12,79                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 5           | 163800,00                         | 37000,00  | 14000,00  | 614000,00  | 155,97                               |
| 80.            | 703785    | AA      | Proteini        | 5           | 3,13                              | 3,26      | 2,78      | 3,34       | 7,64                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 5           | 3,36                              | 3,90      | 1,65      | 4,67       | 38,22                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 5           | 26,14                             | 26,80     | 23,60     | 27,80      | 6,20                                 |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 5           | 130000,00                         | 152000,00 | 15000,00  | 273000,00  | 85,88                                |
| 81.            | 524105    | AA      | Proteini        | 6           | 3,51                              | 3,49      | 2,90      | 4,16       | 12,15                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,48                              | 3,37      | 2,93      | 4,49       | 16,70                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 28,67                             | 28,55     | 25,80     | 32,80      | 9,41                                 |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 101166,67                         | 95000,00  | 44000,00  | 182000,00  | 45,04                                |

Tabela 2. Osnovni statistički pokazatelji za posmatrane parametre kod ispitivanih krava (nastavak)

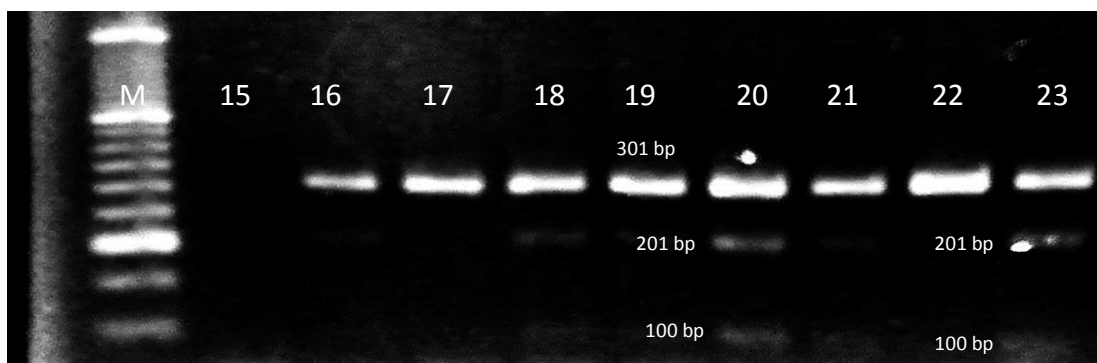
| Red. br. krave | Br. krave | Genotip | Parametar       | Br. merenja | Aritmetička sredina ( $\bar{x}$ ) | Medijana  | Minimum   | Maksimum   | Koeficijent varijacije ( $c_v$ ) u % |
|----------------|-----------|---------|-----------------|-------------|-----------------------------------|-----------|-----------|------------|--------------------------------------|
| 82.            | 703699    | AA      | Proteini        | 6           | 3,58                              | 3,55      | 3,38      | 3,84       | 4,68                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,39                              | 3,24      | 3,01      | 4,14       | 13,10                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 23,32                             | 22,80     | 20,00     | 28,70      | 14,06                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 166333,33                         | 53000,00  | 19000,00  | 710000,00  | 161,79                               |
| 83.            | 837091    | AA      | Proteini        | 6           | 3,06                              | 3,09      | 2,79      | 3,16       | 4,41                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 2,83                              | 2,54      | 2,24      | 4,30       | 26,46                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 23,05                             | 25,20     | 10,20     | 34,30      | 36,71                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 798833,33                         | 374500,00 | 134000,00 | 2776000,00 | 125,76                               |
| 84.            | 703969    | AA      | Proteini        | 3           | 3,73                              | 3,74      | 3,52      | 3,94       | 5,63                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 3           | 3,87                              | 3,65      | 3,62      | 4,35       | 10,66                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 3           | 21,37                             | 25,10     | 10,40     | 28,60      | 45,20                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 3           | 151333,33                         | 154000,00 | 38000,00  | 262000,00  | 74,02                                |
| 85.            | 524017    | AA      | Proteini        | 2           | 3,53                              | 3,53      | 3,43      | 3,62       | 3,81                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 2           | 2,96                              | 2,96      | 2,19      | 3,72       | 36,61                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 2           | 17,75                             | 17,75     | 15,70     | 19,80      | 16,33                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 2           | 624000,00                         | 624000,00 | 220000,00 | 1028000,00 | 91,56                                |
| 86.            | 703733    | AA      | Proteini        | 6           | 3,56                              | 3,38      | 3,27      | 4,46       | 12,66                                |
|                |           |         | Mlečna mast     | 6           | 3,93                              | 3,93      | 2,55      | 5,27       | 22,24                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 6           | 15,97                             | 15,90     | 10,70     | 21,20      | 25,57                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 6           | 592500,00                         | 235500,00 | 154000,00 | 2407000,00 | 150,40                               |
| 87.            | 790440    | AA      | Proteini        | 3           | 3,71                              | 3,69      | 3,35      | 4,08       | 9,85                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 3           | 4,57                              | 4,10      | 3,86      | 5,76       | 22,62                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 3           | 21,20                             | 21,20     | 19,10     | 23,30      | 9,91                                 |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 3           | 125666,67                         | 154000,00 | 68000,00  | 155000,00  | 39,74                                |
| 88.            | 95412     | AA      | Proteini        | 3           | 3,55                              | 3,57      | 3,44      | 3,63       | 2,74                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 3           | 4,06                              | 4,41      | 2,79      | 4,97       | 27,91                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 3           | 17,20                             | 18,20     | 12,00     | 21,40      | 27,79                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 3           | 254333,33                         | 259000,00 | 174000,00 | 330000,00  | 30,71                                |
| 89.            | 703613    | AA      | Proteini        | 4           | 3,77                              | 3,78      | 3,46      | 4,08       | 6,86                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 4           | 4,03                              | 4,13      | 2,64      | 5,21       | 29,04                                |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 4           | 21,33                             | 22,20     | 13,90     | 27,00      | 26,76                                |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 4           | 118500,00                         | 68000,00  | 58000,00  | 280000,00  | 90,95                                |
| 90.            | 703946    | AA      | Proteini        | 2           | 3,56                              | 3,56      | 3,33      | 3,78       | 8,95                                 |
|                |           |         | Mlečna mast     | 2           | 2,71                              | 2,71      | 0,66      | 4,75       | 106,92                               |
|                |           |         | Ukupna mlečnost | 2           | 27,60                             | 27,60     | 26,30     | 28,90      | 6,66                                 |
|                |           |         | Ukupno SCC      | 2           | 115000,00                         | 115000,00 | 14000,00  | 216000,00  | 124,20                               |



Slika 6. Rezultati PCR reakcije za laktoferin gen, 2% agarozni gel obojen etidijum bromidom, M-lader 100 bp, uzorci 1-10



Slika 7. Rezultati PCR-RFLP reakcije za LTF gen, 2% agarozni gel, restrikcioni enzim *Eco RI*. Genotip AA: uzorci 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13. Genotip AB: uzorci 1 i 14. M lader 100 bp.



Slika 8. Rezultati PCR-RFLP reakcije za LTF gen, 2% agarozni gel, restrikcioni enzim *Eco RI*. Genotip AA: uzorci 16, 17, 18, 19, 21, 22, Genotip AB: uzorci 20 i 23, uzorak 15 negativna kontrola, M lader 50 bp.

U uzorku od 90 krava grla nisu bila ravnomerno izabrana iz starosnih grupa ( $\chi^2=17,333$ ;  $p=0,004$ ). Njbrojnije su bile krave stare 4 godine, a najmanje je bilo krava starih 7 godina (najstarijih) i 2 godine (najmlađih).

Tabela 3. Starosna struktura posmatranih grla (u %)

| Starost krava<br>(god) | Prvi deo<br>ogleda<br>A | Drugi deo<br>ogleda<br>B | Ukupno<br>(A+B) |
|------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------|
| 2                      | 19,57                   | -                        | 10,00           |
| 3                      | 10,87                   | 15,91                    | 13,33           |
| 4                      | 28,26                   | 27,27                    | 27,78           |
| 5                      | 19,57                   | 25,00                    | 22,22           |
| 6                      | 17,39                   | 22,73                    | 20,00           |
| 7                      | 4,35                    | 9,09                     | 6,67            |

U uzorku od 90 grla raspored krava po laktacijama bio je ravnomeran ( $\chi^2=0,578$ ;  $p=0,902$ ), tj nije se statistički značajno razlikovao broj krava u laktacionim grupama.

Tabela 4. Raspored krava po laktacijama u uzorcima sa posmatrane farme (u %)

| Br.<br>Laktacije | Prvi deo<br>ogleda A | Drugi deo<br>ogleda B | Ukupno (A+B) |
|------------------|----------------------|-----------------------|--------------|
| 1                | 30,43                | 20,45                 | 25,56        |
| 2                | 23,91                | 25,00                 | 24,44        |
| 3                | 19,57                | 25,00                 | 22,22        |
| 4                | 26,09                | 29,55                 | 27,78        |

## 5.2. Rezultati odnosa krava prema genotipu i starosti

Grla genotipa AA imala su 2-7 godina i nisu ravnomerno raspoređena po godinama starosti ( $\chi^2=16,491$ ;  $p=0,006$ ). Najčešća su sa 4 i 5 godina starosti, a najmanje je starih 2 i 7 godina.

Tabela 5. Raspored krava prema starosti i genotipu

| Starost krava<br>(god) | Genotip AA |        | Genotip AB |        |
|------------------------|------------|--------|------------|--------|
|                        | broj krava | %      | broj krava | %      |
| 2                      | 5          | 6,76   | 4          | 25,00  |
| 3                      | 9          | 12,16  | 3          | 18,75  |
| 4                      | 19         | 25,68  | 6          | 37,50  |
| 5                      | 18         | 24,32  | 2          | 12,50  |
| 6                      | 17         | 22,97  | 1          | 6,25   |
| 7                      | 6          | 8,11   | -          | 0,00   |
| Ukupno                 | 74         | 100,00 | 16         | 100,00 |

Prema starosti heterogenije su krave u okviru genotipa AB. Podaci za starost krava genotipa AA nisu normalno distribuirani (Shapiro-Wilk  $W=0,935$ ,  $p=0,001$ ), a za genotip AB jesu (Shapiro-Wilk  $W=0,906$ ;  $p=0,100$ ). Varijanse ove dve grupe su homogene (Levene  $F=0,467$ ;  $p=0,496$ ). Rezultati Mann-Whitney U testa ( $z=2,903$ ;  $p=0,004$ ) ukazuju da su posmatrane krave genotipa AA vrlo značajno starije od posmatranih krava genotipa AB.



Tabela 6. Raspored krava različitih genotipova po starosti

| Genotip | Aritmetička sredina | Medijana | Min. | Max. | Standardna devijacija | Koeficijent varijacije (%) | Standardna greška |
|---------|---------------------|----------|------|------|-----------------------|----------------------------|-------------------|
| AA      | 4,69                | 5,00     | 2,00 | 7,00 | 1,35                  | 28,88                      | 0,16              |
| AB      | 3,56                | 4,00     | 2,00 | 6,00 | 1,21                  | 33,95                      | 0,30              |

### 5.3. Rezultati odnosa krava prema genotipu i laktacijama

Među posmatranim kravama sa genotipom AA najveći deo (31,08%) je imao 4 laktacije (maksimalan broj), dok su među kravama sa genotipom AB bile najzastupljenije krave sa jednom laktacijom (43,75%)-minimalan broj.

Tabela 7. Raspored krava prema laktacijama i genotipu

| Laktacija | Genotip AA |        | Genotip AB |        |
|-----------|------------|--------|------------|--------|
|           | broj krava | %      | broj krava | %      |
| 1         | 16         | 21,62  | 7          | 43,75  |
| 2         | 17         | 22,97  | 5          | 31,25  |
| 3         | 18         | 24,32  | 2          | 12,5   |
| 4         | 23         | 31,08  | 2          | 12,5   |
| Ukupno    | 74         | 100,00 | 16         | 100,00 |

Grupa krava sa genotipom AA, kao i grupa krava sa genotipom AB nije bila homogena prema broju laktacija (koeficijenti varijacije su veći od 30%). Prema rezultatima Levene-ovog testa varijanse ovih uzoraka su bile homogene ( $F=1,656$ ;  $p=0,201$ ). Rezultati Shapiro-Wilk-ovog testa ukazuju i da raspored grla po broju laktacija vrlo značajno odstupa od teorijskog modela normalne raspodele za genotip AA ( $W=0,846$ ;  $p<0,001$ ) i za genotip AB ( $W=0,809$ ;  $p=0,004$ ). S obzirom na ove

karakteristike podataka testiranje razlike u prosečnom broju laktacija krava sa genotipom AA i genotipom AB izvršeno je Mann-Whitney-evim U testom. Dobijeni rezultati,  $z=2,230$  i  $p=0,026$ , ukazuju da su se ove dve grupe krava značajno razlikovale po broju laktacija.

Tabela 7. Raspored krava po laktaciji i genotipovima (nastavak)

| Genotip | Aritmetička sredina | Medijana | Min. | Max. | Standardna devijacija | Koeficijent varijacije (%) | Standardna greška |
|---------|---------------------|----------|------|------|-----------------------|----------------------------|-------------------|
| AA      | 2,65                | 3,00     | 1,00 | 4,00 | 1,14                  | 43,04                      | 0,13              |
| AB      | 1,94                | 2,00     | 1,00 | 4,00 | 1,06                  | 54,85                      | 0,27              |

### 5.5. Proizvodne karakteristike

Količina proteina u mleku krava sa genotipom AA kretala se od 2,92 do 3,77 % , a kod krava sa genotipom AB iznosila je između 3,05% i 3,46% . Pri tom, vrednosti u uzorcima su bile homogene ( $c_v$ : 5,95% i 3,32%), s tim što varijanse uzoraka nisu bile homogene (za Levene-ov test  $p=0,017$ ) . Količina proteina u mleku nije sledila teorijski model normalne raspodele kod krava sa genotipom AA ( $p=0,010$ ), dok kod krava sa genotipom AB jeste ( $p=0,248$ ). S obzirom da nisu ispunjeni uslovi za primenu parametarskog testa (varijanse uzoraka nisu homogene i podaci u uzorcima ne slede normalnu raspodelu), kao i da brojnim transformacijama podataka to nije postignuto, testiranje razlike prosečnih količina proteina kod ove dve grupe krava sprovedeno je neparametarskim Mann-Whitney U testom. Na osnovu ovog testa ( $z=1,161$ ;  $p=0,246$ ), može se zaključiti da statistički nije značajna razlika u prosečnoj količina proteina u mleku krava sa genotipom AA i krava sa genotipom AB.

Kod krava genotipa AA količina mlečne masti varirala je između 2,71% i 4,92% i bila je homogena ( $c_v=12,09\%$ ). Grla genotipa AB bila su takođe homogena ( $c_v=8,68\%$ ) prema količini mlečne masti koja se kretala između 3,12% i 4,56%. Posmatrane grupe krava imale su homogene varijanse (za Levene-ov test  $p=0,087$ ). U uzorcima vrednosti

za mlečnu mast nisu sledile normalnu raspodelu ( $p_{AA}=0,020$  i  $p_{AB}=0,015$ ). Rezultati Mann-Whitney U testa ( $z=1,710$ ;  $p=0,087$ ) ukazuju da različiti genotipovi ne prouzrokuju statistički značajnu razliku u količini mlečne masti. Preko transformacije podataka u novu varijablu  $y = 1/\sqrt{x+1}$  ispunjen je zahtev za primenu parametarskog t testa za ispitivanje značajnosti razlika sredina. t-testom ( $t=1,244$ ;  $p=0,217$ ) je potvrđen zaključak donet na osnovu Mann-Whitney U testa.

Tabela 8. Osnovni statistički pokazatelji parametara mleka kod krava posmatranih genotipova

| Genotip | Parametri mleka | Aritmet. Sredina | Medijana | Interval varijacije | Koef. varijacije | W test (p)       |
|---------|-----------------|------------------|----------|---------------------|------------------|------------------|
| AA      | Proteini        | 3,29             | 3,25     | 2,92-3,77           | 5,95             | <b>0,010</b>     |
|         | ml.mast         | 3,79             | 3,71     | 2,71-4,92           | 12,09            | <b>0,020</b>     |
|         | proiz.mleka     | 31,86            | 33,17    | 12,92-49,17         | 23,72            | 0,169            |
|         | ukupno SC       | 368880,9         | 186750,0 | 31200-2307000       | 116,84           | <b>&lt;0,001</b> |
| AB      | Proteini        | 3,22             | 3,19     | 3,05-3,46           | 3,32             | 0,248            |
|         | ml.mast         | 3,63             | 3,57     | 3,12-4,56           | 8,68             | <b>0,015</b>     |
|         | proiz.mleka     | 32,02            | 31,18    | 16,50-40,83         | 20,07            | 0,286            |
|         | ukupno SC       | 311084,1         | 212800,0 | 28800,0-1030600,0   | 89,84            | <b>0,027</b>     |

Proizvodnja mleka je varirala više od prethodnih parametara, ali i za ovaj parametar vrednosti u uzorcima su homogene, s tim što su više varirale kod krava genotipa AA ( $c_v=23,72\%$ ). Minimalna proizvodnja mleka kod krava sa genotipom AA bila je 12,92 l, a maksimalna 49,17 l. Kod krava genotipa AB zabeležena je minimalna proizvodnja mleka od 16,50 l i maksimalna od 40,83 l. Prema nivoima značajnosti Shapiro-Wilk-ovog testa ( $p_{AA}=0,169$  i  $p_{AB}=0,286$ ) podaci su sledili normalnu teorijsku raspodelu, a prema Leveneovom testu uzorci su imali homogene varijanse ( $F=0,480$ ;  $p=0,490$ ). S obzirom da su ispunjeni uslovi za primenu parametarskog testa (podaci u

uzorcima slede normalnu raspodelu i varijanse uzoraka su homogene) testiranje razlike aritmetičkih sredina proizvedene količine mleka kod ove dve grupe krava izvršeno je t-testom i može se zaključiti da postojeća razlika u proizvedenoj količini mleka nije statistički značajna ( $t=0,079$ ;  $p=0,938$ ).

Najvarijabilniji proizvodni parametar je ukupan broj somatskih ćelija ( $c_{vAA} = 116,84\%$ ,  $c_{vAB} = 89,84\%$ ). Samo su za ovaj parametar podaci u uzorcima heterogeni ( $c_v > 30\%$ ). Broj somatskih ćelija kretao se od 31200 do 2307000 kod krava genotipa AA i od 28800 do 1030600 kod krava sa genotipom AB. Shapiro-Wilk-ov W test je ukazao da podaci ne slede model normalne raspodele ( $p_{AA} < 0,001$  i  $p_{AB} = 0,027$ ), pa je i pored homogenih varijansi (za Levene-ov test  $F=0,844$ ;  $p=0,361$ ) za utvrđivanje značajnosti razlike u prosečnom broju somatskih ćelija korišćen Mann-Whitney U test. Prema U testu ( $z=0,095$ ;  $p=0,924$ ) ukupan broj somatskih ćelija ne razlikuje se statistički značajno kod krava različitih genotipova. Transformacijom podataka za ukupan broj somatskih ćelija u promenljivu  $y = \log x$ , dobijeni su normalno distribuirani podaci sa homogenim varijansama na koje je primenjen t-test. I rezultati t-testa ( $t=0,297$ ;  $p=0,767$ ) su ukazali da razlika u prosečnom ukupnom broju somatskih ćelija kod krava genotipa AA i genotipa AB nije statistički značajna.

## 5.6. Diskriminaciona analiza eksperimentalnih podataka

Za analizu eksperimentalnih podataka korišćena je i diskriminaciona analiza. U cilju ispunjenja uslova za primenu ove metode i dobijanja što pouzdanijih rezultata izvršena je transformacija podataka za dva parametra mleka. Količina proteina zamenjena je rangovima, na količinu mlečne masti primenjena je transformacija  $y = 1/\sqrt{x+1}$ , a o proizvodnji mleka korišćeni su originalni podaci.

Diskriminacionom analizom je potvrđeno da se vrednosti pojedinačnih parametara mleka (tabela ) ne razlikuju statistički značajno kod krava sa genotipovima AA i AB. Takođe, utvrđeno je da se krave sa genotipovima AA i AB ne razlikuju statistički značajno prema parametrima mleka posmatranim istovremeno (Wilks' Lambda: 0,965 approx.  $F=1,028$   $p < 0,384$ ).

Tabela 9. Rezultati diskriminacije krava sa genotipom AA i genotipom AB prema parametrima proizvodnje mleka

| Parametar         | Wilks' Lambda | F     | Nivo značajnosti (p) |
|-------------------|---------------|-------|----------------------|
| Proteini          | 0,973         | 1,546 | 0,217                |
| Mlečna mast       | 0,989         | 2,066 | 0,154                |
| Proizvodnja mleka | 0,962         | 0,114 | 0,737                |
| Ukupno            | 0,965         | 1,028 | 0,384                |

Na osnovu diskriminacione analize dobijena je i informacija da prema posmatranim proizvodnim osobinama 98,89% krava pripada istoj grupi, a samo jedna tj. 1,11% se razlikuje toliko da treba da čini posebnu grupu. To grlo ima genotip AA, a prema rezultatima u proizvodnji mleka značajno se razlikuje od ostalih grla. Diskriminaciona analiza je ukazala i da ni jedno grlo genotipa AB nema vrednosti parametara mleka koje bi ga razdvojile od krava sa genotipom AA..

### 5.7. Korelacija za genotip AA

Korelacija između:

- starosti grla i broja laktacija je pozitivna i vrlo jaka (vrlo značajna)
- mlečne masti i ukupnog broja somatskih ćelija je vrlo jaka (vrlo značajna) negativna (sa porastom br. somatskih ćelija smanjuje se količina mlečne masti i suprotno)
- mlečne masti i broja laktacija je jaka (značajna) negativna (sa porastom broja laktacija značajno se smanjuje količina mlečne masti)
- proizvodnje mleka i proteina je značajna tj. jaka negativna (sa povećanjem proizvodnje značajno se smanjuje količina proteina)

Tabela 10. Spearman-ovi koeficijenti korelacije za krave sa genotipom AA

| Parametar             | Laktacija    | Proteini | Količina mlečne masti | Proizvodnja mleka | Uukupan broj SC |
|-----------------------|--------------|----------|-----------------------|-------------------|-----------------|
| Starost               | <b>0,881</b> | 0,077    | -0,173                | -0,106            | -0,001          |
| Laktacija             |              | 0,205    | <b>-0,243</b>         | -0,043            | 0,034           |
| Proteini              |              |          | -0,192                | <b>-0,243</b>     | 0,107           |
| Količina mlečne masti |              |          |                       | -0,153            | <b>-0,363</b>   |
| Proizvodnja mleka     |              |          |                       |                   | 0,127           |

### 5.8. Korelacija za genotip AB

Kod ovog genotipa samo je korelacija između starosti grla i broja laktacija vrlo jaka (vrlo značajna) i pozitivna (što je grlo starije ima veći broj laktacija)

Tabela 11. Spearman-ovi koeficijenti korelacije za krave sa genotipom AB

| Parametar             | Laktacija    | Proteini | Količina mlečne masti | Proizvodnja mleka | Uukupan broj SC |
|-----------------------|--------------|----------|-----------------------|-------------------|-----------------|
| Starost               | <b>0,946</b> | 0,170    | -0,273                | 0,426             | 0,249           |
| Laktacija             |              | 0,145    | -0,299                | 0,424             | 0,394           |
| Proteini              |              |          | -0,009                | 0,256             | -0,156          |
| Količina mlečne masti |              |          |                       | -0,368            | -0,341          |
| Proizvodnja mleka     |              |          |                       |                   | -0,074          |

Korelacioni koeficijenti za dva posmatrana genotipa statistički značajno se ne razlikuju (sledeća tabela). Najsličnije vrednosti su za odnos mlečne masti i ukupan broj somatskih ćelija, a najviše, ali ne i značajno, razlikuju se odnosi starosti i proizvodnje mleka.

Tabela 12. Nivoi značajnosti razlika korelacionih koeficijenata genotipa AA i genotipa AB

| Parametar             | Laktacija | Proteini | Količina mlečne masti | Proizvodnja mleka | Ukupan broj SC |
|-----------------------|-----------|----------|-----------------------|-------------------|----------------|
| Starost               | 0,176     | 0,755    | 0,728                 | 0,066             | 0,400          |
| Laktacija             |           | 0,838    | 0,842                 | 0,104             | 0,208          |
| Proteini              |           |          | 0,540                 | 0,094             | 0,383          |
| Količina mlečne masti |           |          |                       | 0,444             | 0,934          |
| Proizvodnja mleka     |           |          |                       |                   | 0,505          |

### 5.9. Analiza genotipova prema broju somatskih ćelija

U celom uzorku krave sa manje od 400.000 somatskih ćelija učestvovala su sa 71,11%. U genotipu AA 72,97% krava imalo je do 400.000 somatskih ćelija, a 27,03% preko 400000. U genotipu AB 62,50% krava imalo je do 400.000 somatskih ćelija, a 37,50% preko 400.000. Struktura krava po broju somatskih ćelija nije se statistički značajno razlikovala u posmatranim genotipovima ( $\chi^2=0,702$ ;  $p=0,402$ ). Raspored krava po broju somatskih ćelija ne zavisi od laktacije ( $\chi^2=0,320$ ;  $p=0,956$ ).

Vrednosti za posmatrane parametre mleka bile su homogene kod krava sa manje od 400.000 somatskih ćelija i kod krava sa više od 400.000 somatskih ćelija (koeficijenti varijacije su ispod 30%). S tim što su homogenije vrednosti kod krava sa više od 400000 SC.

U grupi grla sa manje od 400.000 SC proteini nisu imali normalnu raspodelu, pa je Mann-Whitney-evim testom ( $z=0,067$ ;  $p=0,947$ ) utvrđeno da se posmatrane grupe grla statistički značajno ne razlikuju. Prema Levene-ovom testu ( $F=14,019$ ;  $p<0,001$ ) uzorci nisu imali homogene varijanse za količinu mlečne masti i zato je Mann-Whitney-evim testom proverena značajnost razlike u količini mlečne masti. S obzirom da je uzoračka vrednost  $z$  statistike 3,472 značajna na nivou 0,0005, prihvata se da je razlika u količini mlečne masti posmatrane dve grupe krava statistički vrlo značajna. Podaci za proizvodnju mleka su normalno distribuirani u posmatranim uzorcima, a i uzoračke varijanse su homogene (za Levene-ov test  $F=0,167$  i  $p=0,683$ ), pa su prosečne proizvedene količine mleka upoređene t-testom. Na osnovu realizacije u uzorcima je  $t=1,807$  sa nivoom značajnosti 0,074, pa se može zaključiti da se prosečna proizvodnja mleka ne razlikuje kod krava sa manje od 400.000SC i krava sa više od 400.000SC.

Tabela 13. Osnovni statistički pokazatelji parametara mleka kod krava sa do 400.000 i preko 400.000 somatskih ćelija

| Br. SC  | Parametri mleka | Aritmet. Sredina | Medijana | Interval varijacije | Koef. varijacije | W test (p)   |
|---------|-----------------|------------------|----------|---------------------|------------------|--------------|
| ≤400000 | Proteini        | 3,28             | 3,23     | 2,92-3,77           | 6,18             | <b>0,003</b> |
|         | ml.mast         | 3,85             | 3,80     | 2,71-4,92           | 12,46            | 0,185        |
|         | proiz.mleka     | 31,01            | 31,58    | 12,92-49,17         | 23,93            | 0,403        |
| >400000 | Proteini        | 3,25             | 3,24     | 3,01-3,53           | 0,13             | 0,749        |
|         | ml.mast         | 3,54             | 3,56     | 2,96-3,90           | 0,19             | 0,175        |
|         | proiz.mleka     | 34,05            | 35,43    | 17,75-43,17         | 6,78             | 0,081        |



Posle zamene vrednosti za proteine i količinu mlečne masti sa rangovima primenjen je metod diskriminacione analize. Prema dobijenim rezultatima (tabela ), prema parametrima proizvodnje mleka krave sa preko 400.000 somatskih ćelija statistički vrlo značajno se razlikuju od krava sa manjim brojem somatskih ćelija (Wilks' Lambda: 0,844 approx.  $F=5,309$   $p< 0,002$ ). Ta razlika je posledica statistički vrlo značajne razlike u količini masti u mleku kod ove dve grupe krava (Wilks' Lambda: 0,963 approx.  $F=512,183$   $p<0,001$ ).

Tabela 14. Rezultati diskriminacije prema parametrima proizvodnje mleka krava sa do 400.000 i preko 400.000 somatskih ćelija

| Parametar             | Wilks' Lambda | F      | Nivo značajnosti (p) |
|-----------------------|---------------|--------|----------------------|
| Proteini              | 0,844         | 0,069  | 0,793                |
| Količina mlečne masti | 0,963         | 12,183 | 0,001                |
| Proizvodnja mleka     | 0,859         | 1,520  | 0,221                |
| Ukupno                | 0,844         | 5,309  | 0,002                |

Tabela 15. Učešće krava sa do 400.000 SCC i preko 400.000 SCC po genotipovima

| Genotip | $\leq 400000$ | $> 400000$ | Ukupno |
|---------|---------------|------------|--------|
| AA      | 54            | 20         | 74     |
| %       | 72,97%        | 27,03%     |        |
| AB      | 10            | 6          | 16     |
| %       | 62,50%        | 37,50%     |        |
| Ukupno  | 64            | 26         | 90     |

Učešće krava sa do 400.000 SCC i preko 400.000 ne zavisi od genotipa ( $\chi^2=0,702$ ;  $p=0,402$ ).

Tabela 16. Osnovni statistički pokazatelji parametara mleka kod krava  
posmatranih genotipova

| Genotip | Ukupno SCC | Parametri mleka | Arit.<br>sredina | Medijana | Interval varijacije | Koef.<br>varijacije | W test<br>(p) |
|---------|------------|-----------------|------------------|----------|---------------------|---------------------|---------------|
| AA      | ≤400000    | Proteini        | 3,29             | 3,23     | 2,92-3,77           | 6,52                | <b>0,010</b>  |
|         |            | Mlečna mast     | 3,88             | 3,84     | 2,71-4,92           | 12,73               | 0,426         |
|         |            | Ukupna mlečnost | 31,01            | 31,58    | 12,92-49,17         | 24,33               | 0,547         |
|         | >400000    | Proteini        | 3,28             | 3,27     | 3,01-3,53           | 4,14                | 0,905         |
|         |            | Mlečna mast     | 3,55             | 3,57     | 2,96-3,90           | 5,92                | 0,148         |
|         |            | Ukupna mlečnost | 34,16            | 35,43    | 17,75-43,17         | 21,32               | 0,062         |
| AB      | ≤400000    | Proteini        | 3,24             | 3,19     | 3,08-3,46           | 3,71                | 0,348         |
|         |            | Mlečna mast     | 3,69             | 3,58     | 3,12-4,56           | 10,28               | 0,211         |
|         |            | Ukupna mlečnost | 31,01            | 31,18    | 16,50-40,83         | 22,84               | 0,825         |
|         | >400000    | Proteini        | 3,18             | 3,19     | 3,05-3,28           | 2,36                | 0,403         |
|         |            | Mlečna mast     | 3,51             | 3,48     | 3,39-3,66           | 3,24                | 0,235         |
|         |            | Ukupna mlečnost | 33,69            | 33,83    | 28,00-39,00         | 15,73               | <b>0,039</b>  |

Prema rezultatu diskriminacije analize krave sa do 400.000 SCC i preko 400.000SCC genotipa AA vrlo značajno se razlikuju po posmatranim pokazateljima analiziranim istovremeno ( $p=0,006$ ; tabela 17). Ta razlika je posledica vrlo značajne razlike u količini mlečne masti ( $p=0,001$  odnosno  $0,003$ ). Kod krava genotipa AB sa različitim brojem SCC posmatrani parametri se pojedinačno, pa i istovremeno ne razlikuju statistički značajno ( $p>0,05$ ).

Tabela 17. Nivoi značajnosti razlika u proizvodnim osobinama krava sa do 400 000 SCC i preko 400.000 SCC u istom genotipu

| Genotip | Pokazatelj         | Nivoi značajnosti (p) |        |              |                            |       |
|---------|--------------------|-----------------------|--------|--------------|----------------------------|-------|
|         |                    | Levene-<br>ov test    | t-test | U-test       | Diskriminaciona<br>analiza |       |
| AA      | Proteini           | <b>0,044</b>          | -      | 0,761        | 0,950                      | 0,006 |
|         | Mlečna mast        | <b>0,002</b>          | -      | <b>0,001</b> | <b>0,003</b>               |       |
|         | Ukupna<br>mlečnost | 0,768                 | 0,112  | -            | 0,232                      |       |
| AB      | Proteini           | 0,064                 | 0,298  |              | 0,290                      | 0,553 |
|         | Mlečna mast        | 0,122                 | 0,279  |              | 0,464                      |       |
|         | Ukupna<br>mlečnost | 0,809                 | -      | 0,515        | 0,874                      |       |

## 6. DISKUSIJA

Otkrivanje specifičnih DNK markera za lokuse koji kodiraju ekonomski značajne osobine omogućava efikasniju i relativno laku selekciju i ukrštanje životinja na farmama radi povećanja heritabilnosti željenih osobina, kao što su dinamika rasta, telesna masa, karakteristike trupa, unos hrane, količina i sastav mleka. Do sada je identifikovano nekoliko lokusa za navedene osobine, ali i veći broj gena za koje istraživanja ukazuju da mogu da utiču na ove osobine, ali neophodne su dalje analize efekata ovih gena na fiziološke i biohemijske osobine goveda, kao i na njihove produktivne sposobnosti. Treba istaći da se retko događa da jedan određeni polimorfizam gena može da utiče na nekoliko ekonomski važnih karakteristika u isto vreme. Postupak genetičke identifikacije krava povećane osetljivosti prema mastitisu predstavlja polaznu osnovu za savremeni pristup selekciji na osnovu molekularnih markera. Ogorevc i sar. (2009) iznose u svojim istraživanjima podatak o 943 kandidat gena povezanih sa mlečnom žlezdom, koji su do tada otkriveni i koji se kroz proces marker-asistirane selekcije mogu koristiti.

Laktoferin, kao glikoprotein i član familije transferin proteina igra važnu ulogu u odbrani mlečne žlezde od egzogenih i endogenih infekcija u okviru druge linije odbrane. U mleku zdravih krava, utvrđen je širok raspon koncentracija laktoferina. Vrednosti koncentracije laktoferina variraju od 1.5 µg/ml do 485.63 µg/ml. Dokazano je da je laktoferin značajno povezan sa stadijumom laktacije ( $r = 0.557$ ) i dnevnom proizvodnjom mleka ( $r = -0.472$ ), (Cheng i sar. 2008). Ove koncentracije rastu više puta (do 100 µg/ml) tokom involucije mlečne žlezde (Welty i sar. 1976).

Imajući sve ovo u vidu u cilju praćenja polimorfizma LTF gena u populaciji HF krava u Srbiji, izabrali smo 90 krava HF rase držanih u istovetnim uslovima i podeljenih u grupe po laktacijama od prve do četvrte. Sličan ogled izveden je od strane Woydac-Maksimiec (2006) godine, na sličnom uzorku od 124 krave iste rase u Poljskoj. Sa druge strane Colarado i sar. (2013) takođe ispituju polimorfizam LTF gena na intronu 6 na većem uzorku od 382 krave u Kolumbiji, a Doust i sar. (2014) sprovode skoro istovetno istraživanje u Iranu na 121 kravi. Ovo ukazuje da je broj praćenih životinja u skladu sa sličnim istraživanjima u Evropi i svetu. U našem istraživanju krave su bile podeljene prema laktacionoj starosti u četiri grupe (1-4). Kao dodatni parametar praćena

je i biološka starost. U uzorku od 90 krava grla nisu bila ravnomerno izabrana iz starosnih grupa ( $\chi^2=17,333$ ;  $p=0,004$ ). Najbrojnije su bile krave stare 4 godine, a najmanje je bilo krava starih 7 godina (najstarijih) i 2 godine (najmlađih). Biološka starost nije značajnije uticala na rezultat istraživanja jer je distribucija ili raspored krava po laktacijama bio je ravnomeran ( $\chi^2=0,578$ ;  $p=0,902$ ), tj nije se statistički značajno razlikovao broj krava u laktacionim grupama.

Nakon izolacije DNK i identifikacije genotipova metodom PCR-RFLP utvrđeno je postojanje 2 genotipa, AA i AB dok genotip BB nije ustanovljen u našem uzorku. Konstatovana je statistički vrlo značajna veća ( $\chi^2=40,894$ ;  $p<0,001$ ) zastupljenost genotipa AA (74 ili 82,22%) u odnosu na zastupljenost BB genotipa (16 ili 7,78%). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima Anggraeni i sar. (2013), koji je pratio polimorfizam LTF gena na intronu 6 kod 89 HF krava i utvrdio je postojanje samo dva genotipa AA i AB, dok BB genotip nije otkriven u praćenoj populaciji. Javanmard i sar. (2005) ističu da ako je broj heterozigotnih jedinki manji od 50% to ukazuje na malu varijaciju gena u populaciji. Gursel i sar (2013) su ispitivali polimorfizam LTF gena kao i distribuciju alela i genotipova kod dve autohtone rase krava u Turskoj. Eksperiment je obuhvatao po 46 jedinki u obe grupe. Praćene su promene na intronu 6 metodom RFLP pomoću restriktionog enzima Eco RI. U prvoj grupi Južnog Anatonskog govečeta (JAG) od 46 krava utvrđeno je prisustvo 3 genotipa: AA (11 grla), AB (21 grlo) i BB (14 grla), dok je frekvencija alela bila  $A=0,467$  prema  $B=0,5326$ . Dobijeni rezultat ne ukazuje na značajno odstupanje od HW ekvilibrijuma. U populaciji Severnog Anatonskog govečeta (SAG) bila je slična situacija: AA (18 grla), AB (22 grla) i BB (6 grla), dok je distribucija alela bila sledeća  $A=0,630$  prema  $B=0,370$ . Takođe, nije prisutno statistički značajno odstupanje od HW ekvilibrijuma. Uočljiv je značajno veći broj heterozigotnih jedinki u odnosu na naša ispitivanja. Colorado i sar. (2012) u svojim istraživanjima ustanovio je frekvenciju dve alelne forme A i B, 0,78 prema 0,22. Distribucija genotipova se odnosila na tri genotipa AA (60%), BB (36%) i BB (4%). U rezultatima Wojdak-Maksymiec i sar. (2006) koji su pratili distribuciju laktoferin genotipova u populaciji Holštajn-Frizijskih krava u Poljskoj navedeno je da su otkrivene dve alelne forme A i B koje kontrolišu pojavljivanje tri genotipa: AA, AB i BB u odnosu 37,90%, 2,42% i 59, 68%. Primetno je znatno manji procenat heterozigotnih formi AB u odnosu na naše rezultate, dok je istraživanje istog polimorfizma sprovedeno od strane Sendera i

sar. (2010) obuhvatalo 479 HF krava iz Poljske pri čemu je zaključak bio da je genotip AA prisutan sa 63,26%, BB genotip sa 4,8% i AB genotip sa 31,94%. Primetno je, kao i u našem istraživanju dominantno prisustvo AA homozigota i za razliku od naših istraživanja ustanovljeno je prisustvo BB homozigota. Doust i sar. (2014) sprovedli su slično ispitivanje povezanosti polimorfizma LTF gena na intronu 6 sa brojem SCC kod HF krava u Iranu. Ogled je uključivao 121 kravu HF rase. Distribucija 2 alelnih forme A i B bila je 0,85 prema 0,15. Ova dva alela kontrolisali su pojavu 2 od 3 moguća genotipa, AA i AB u odnosu 70,25% prema 29,75%. Opet, kao i u našem istraživanju utvrđena je statistički značajna razlika između homozigotne AA forme u odnosu na heterozigotnu formu AB, dok BB homozigoti nisu pronađeni. Nanei i sar. (2012) ispitivali su polimorfizam laktoferin gena kod 404 Holštajn krave iz provincije Ishvan. Pri tom koristili su isti par prajmera za identifikaciju LTF alelnih formi kao i Wojdacz-Maksymiec (2006). Frekvencija A alelnih forme LTF gena kretala se u rasponu 0,775-0,831 a frekvencija B-alelnih forme 0,169-0,225. Dva genotipa AA i AB proporcionalno su zastupljena sa 60,6% prema 39,4%, dok BB alelna forma nije ustanovljena. Iz navedenog se vidi da je frekvencija AA genotipa daleko zastupljenija nego AB genotipa kao i u našem istraživanju. Druga grupa autora takođe je pratila polimorfizam LTF gena koristeći druge prajmere i restrikcioni enzim ali su rezultati vrlo slični. Jemmali i sar. (2011) su pratili polimorfizam LTF gena kod 52 krave holštajn-rase uvezenih u Tunis. Ustanovljeno je postojanje kodirajućih sekvenci LTF gena kod svih praćenih krava. Pri tom za RFLP analize korišćen je restrikcioni enzim *Hinf I* a kao analizirajući opseg uzet je fragment od 1143 bp  $\pm$ 100 bp. Pri tom je ustanovljeno da su sve krave homozigotne za laktoferin (AA genotip). Sharifzadeh i Doosti (2011) pratili su ekspresiju i polimorfizam gena za laktoferin kod iranskih holštajn bikova pri čemu je DNK ekstrahovana iz sperme. RFLP metodom ustanovljena je distribucija dve alelnih forme (A i B) kroz tri moguća genotipa. Odnos frekvencije ove dve alelnih forme bio je 67,74% prema 32,26%. Aleli kontrolišu pojavljivanje tri genotipa: AA, AB, BB u odnosu 32,5%, 10% i 57,5% prosečno. Zhao i sar. (2009) pratili su dve grupe krava na jednoj farmi u Kini, pri čemu je jednu grupu od 60 životinja činile krave za koje je na osnovu California mastitis testa (CMT) ustanovljeno da boluju od subkliničkog mastitisa (eksperimentalna grupa) i druge grupe od 60 jedinki za koje je ustanovljeno na osnovu CMT testa da su zdrave (ogledna grupa). Nakon PCR reakcije i digestije PCR

produkata pomoću *Hin fI* enzima uradjena je identifikacija nastalih fragmenata i ustanovljene su dve alelne forme ispitivanog promotor laktoferin (LTF) gena (A i B) sa tri moguće kombinacije genotipova (AA, AB i BB). Nakon analize  $\chi^2$  testom uočili su da najveći broj krava u kontrolnoj grupi AA genotipa, dok pojava AB genotipa nije bila statistički značajna. Chopra i sar. (2013) ispitivali su distribuciju genotipova LTF gena u populaciji Sahiwal i Karan frizijskih goveda na uzorku od 350 jedinki. Ispitivan je polimorfizam LTF gena na egzonu 1 dužine 125 baznih parova (bp) metodom SNPs (single nucleotide polymorphism). Utvrđena je distribucija 3 genotipa (AA, AB i BB) u odnosu 18,77%, 76,66% i 4,67% kod Karan goveda. Kod Sahiwal goveda utvrđena su dva genotipa AA i AB u odnosu 61% i 39%. BB genotip u ovoj populaciji nije utvrđen. U svim navedenim istraživanjima primetan je izostanak ili jako mali procenat krava BB genotipa, a razloge za to treba tražiti u radu Sender i sar. (2010) koji navode da je smanjeni broj homozigotnih BB genotipova u populaciji poljskih HF krava najverovatnije posledica ciljane selekcije i isključivanja krava koje nose B alelnu formu zbog niske proizvodnje mleka. Rezultati ovog rada pokazuju da je raspored odnosa krava prema genotipu i laktacijama (tabela 7. ) kod krava sa genotipom AA najveći deo (31,08%) je imao 4 laktacije (maksimalan broj), dok su među kravama sa genotipom AB bile najzastupljenije krave sa jednom laktacijom (43,75%)-minimalan broj. Razlog za ovakav nalaz treba tražiti u značajno većem broju životinja koje pripadaju AA genotipu (82,22%) u odnosu na krave AB genotipa (17,78%) i boljoj disperziji krava u okviru grupe AA genotipa u odnosu na krave AB genotipa.

Ispitivanje odstupanja od Hardy-Weinberg (HW) jednačine distribucije genotipova (jednačina genetičke ravnoteže) se najčešće koristi za proveru stepena slučajnog ukrštanja u populaciji i procenu stepena inbridinga. Populacija teži da bude u ravnoteži kada se frekvencija alela ( $p$  i  $q$ ) i genotipova ( $p^2$ ,  $2pq$  i  $q^2$ ) održava iz generacije u generaciju, tokom slučajnog ukrštanja gameta (Azevedo i sar., 2008). U vezi sa tim, Tambasco i sar., (2000) i Vasconellos i sar. (2003) iznose zaključak da usled akumulacije određenih genotipova, podele populacije, mutacije, selekcije i migracije može doći do narušavanja HW ekvilibrija. U našem istraživanju nije došlo do odstupanja HW jednačine ( $p=0,3547$ ). Ovaj nalaz nije u skladu sa nalazom Doust i sar (2014) i Sherifzadeh i Doosti (2011) koji su u svojim istraživanjima ustanovili odstupanje od HW ekvilibrija za laktoferin kao molekularni marker, ali je u skladu sa

nalazom Gursel i sar (2013) u čijem istraživanju nije došlo do odstupanja od HW jednačine genetičke ravnoteže populacije. Razlog za ovakav nalaz treba tražiti u genetskoj konzervisanosti zapata i izostajanju protoka gena jer se radi o zapatima u kojim nije sproveden remont krava junicama sa drugih farmi a osemenjavanje se sprovodi semenom bikova uz jednog repro-centra.

U cilju praćenja uticaja različitih genotipova za LTF gen u populaciji HF krava u Srbiji i njihovu ekspresiju u fenotipu, odlučili smo se i za kontrolu proizvodnih karakteristika. Kao objektivni parametar pratili smo kvalitativni i kvantitativni sastav mleka. Mleko zdravih krava predstavlja složenu tečnost koju čini veliki broj komponenti. Najvažniji sastojci koji ulaze u sastav mleka su voda (87,1%), laktoza (4,6%), masti (4,0%), proteini (3,3%), organske kiseline (0,17%) i minerali (0,17%) (Walstra i sar., 2006). Jensen i sar. (1991) navode da se u mleku krava HF rase očekuje prosečno 3,2% ukupnih proteina, 3,9% mlečne masti, 2,6% kazeina i 4,6% laktoze. Sastav mleka varira i zavisi od više faktora, pa tako Auldist i sar., (2004) navodi rasu, zatim stadijum laktacije (Ostersen i sar., 1997), broj laktacija (Ng-Kwai-Hang i sar, 1987), godišnje doba (O'Brien i sar., 1999), ishranu (Mackle i sar., 1999) i zdravlje krava (Verdi, i sar., 1987). Nekoliko autora navodi da je koncentracija ukupnih proteina i kazeina veća u kasnijim fazama laktacije nego na njenom početku (Auldist i sar, 1998; Coulon i sar., 1998; Ostersen i sar, 1997). Broj laktacija koje se povezuje sa starošću životinje ima uticaja na koncentraciju proteina. Ng-Kwai-Hang i sar. (1987) izveštavaju da se koncentracija kazeinskih frakcija ( $\alpha$ -CN,  $\beta$ -CN and  $\kappa$ -CN) smanjuje, ali dolazi do povećanja serumskih proteina. U nalazu Schaara (1984) nije nađena korelacija između broja laktacija i ukupne koncentracije kazeina metodom infracrvene spektrofotometrije. Povećana koncentracija serumskih proteina u mleku kod starijih krava je povezana sa povećanom propustljivošću epitela krvnih sudova mlečne žlezde usled stalnih oštećenja prouzrokovanih različitim infekcijama mlečne žlezde (Mackle i sar, 1999). Kod HF krava prosečna koncentracija proteina u mleku iznosi 3,06%, a mlečne masti 3,65% (Bailey i sar, 2005) U našim rezultatima koncentracija proteina se u populaciji krava AA genotipa kretala 2,92-3,77% a kod krava AB genotipa od 3,05-3,46%. Diskriminacionom analizom je potvrđeno da se vrednosti pojedinačnih parametara mleka (tabela 9.) ne razlikuju statistički značajno kod krava sa genotipovima AA i AB. Ovaj nalaz nije u skladu sa istraživanjima Colorada i sar. (2012) koji navodi da je kod



AB genotipa uočena veća proizvodnja ukupnih proteina za 0,18%. Na osnovu korelacione analize za krave genotipa AA uočeno je da postoji negativna korelacija između količine mleka i koncentracije proteina. Ovo je u skladu sa nalazom Krol i sar (2013) koji ukazuje da se sa starošću životinja povećava mlečnost ali istovremeno i opada koncentracija ukupnih proteina u mleku.

U mleku krava prosečne koncentracije ukupne mlečne masti su varijabilne i kreću se od 3,3-3,4% (Lindmark-Mansson, 2008). Koncentracija mlečne masti takođe zavisi od rase, ishrane, individualnih karakteristika i perioda laktacije. Više od 98 % masti mleka čini triacilglicerol, fosfolipidi su zastupljeni sa 0,5-1% i steroli čine 0,2-0,5% (Jensen i sar., 1991). Mlečne masti čine glavni izvor energije mleka. Pored gore navedenih biološki aktivnih supstanci, u sastav masnih kapljica ulaze i vitamini i druge lipolitičke supstance (Parodi 1997, Molkentin, 1999). Triacilglicerol kao glavna komponenta mlečne masti sintetiše se u epitelnim ćelijama mlečnih alveola *de novo* ili iz masnih kiselina dospelih putem krvi (Linzell i Pearker, 1971). Oko 40% ukupnih masti mleka se sastoji od kratkih i srednjih lanaca masnih kiselina (4-14 C atoma) koje su sintetisane iz prekusora putem krvi (acetat i  $\beta$ -hidroksibutirat) i preostalih dugolančanih masnih kiselina čiji su prekursori neesterifikovane masne kiseline (NEFA) i triacilglicerol iz krvi (Linzell i Pearker, 1971). Esterifikacija masnih kiselina odvija se u hrapavom endoplazminom retikulumu, nakon čega lipidne kapljice migriraju prema vrhu epitelne ćelije mlečnih alveola (Linzell i Pearker, 1971).

Kod krava genotipa AA količina mlečne masti varirala je između 2,71% i 4,92% i bila je homogena ( $c_v=12,09\%$ ). Grla genotipa AB bila su takođe homogena ( $c_v=8,68\%$ ) prema količini mlečne masti koja se kretala između 3,12% i 4,56%. Posmatrane grupe krava imale su homogene varijanse (za Levene-ov test  $p=0,087$ ). U uzorcima vrednosti za mlečnu mast nisu sledile normalnu raspodelu ( $p_{AA}=0,020$  i  $p_{AB}=0,015$ ). Rezultati Mann-Whitney U testa ( $z=1,710$ ;  $p=0,087$ ) ukazuju da različiti genotipovi ne prouzrokuju statistički značajnu razliku u količini mlečne masti. Ovi rezultati su u skladu sa istraživanjima Zielak-Steciwo i sar. (2014) koji su na uzorku od 100 HF krava u Poljskoj ustanovili da ne postoji statistička značajnost u pogledu uticaja genotipova za LTF na koncentraciju mlečne masti ( $AA=4,20\pm 1,17\%$ ,  $AB= 4,57\pm 0,82$ ). U ogledu su koristili iste prajmere (Wojdac-Maksymiec, 2006) kao i u ovom istraživanju, pri čemu su otkrivena dva genotipa AA (67,42%) i AB (32,58%), što je u

skladu sa našim rezultatima. U ranijem istraživanju (Maletić i sar., 2013) na uzorku od 46 HF krava, ustanovljeno je diskriminacionom analizom da su grla različitih genotipova (AA i AB) najbližnja po parametru mlečne masti ( $p=0,271$ ).

Proizvodnja mleka je varirala više od prethodnih parametara, ali i za ovaj parametar vrednosti u uzorcima su homogene, s tim što su više varirale kod krava genotipa AA ( $c_v=23,72\%$ ). Minimalna proizvodnja mleka kod krava sa genotipom AA bila je 12,92 l, a maksimalna 49,17 l. Kod krava genotipa AB zabeležena je minimalna proizvodnja mleka od 16,50 l i maksimalna od 40,83 l. Prema ranijem istraživanju (Maletić i sar., 2013) diskriminacionom analizom ustanovljena je statistička značajnost između posmatranih genotipova ( $p=0,021$ ) na manjem uzorku (46 krava). U dostupnoj literaturi nema podataka o uticaju polimorfizma LTF gena na mlečnost kod krava, ali postoji veći broj istraživanja koja ukazuju da na proizvodnju mleka utiče značajan broj paragenetskih faktora, kao što su starost jedinke, faza laktacije, ishrana, zdravstveni status vimena itd. (Bajwa i sar., 2004, Petrović i sar., 2009, Utrera i sar., 2013).

Pored sastav mleka važan parametar u oceni kvaliteta mleka je i broj somatskih ćelija u mleku. Broj somatskih ćelija se koristi kao pokazatelj zdravlja mlečne žlezde i direktno utiče na formiranje cene mleka (Lindmark-Mansson i sar. 2006, Katić, 2007). Povećanje broja somatskih ćelija u mleku nije uvek direktno povezano sa inflamatornim procesom u mlečnoj žlezdi, već i sa stadijumom laktacije, higijenom muže i ispravnošću muzne opreme, upotrebom različitih farmakoloških sredstava, estrusom, itd (Heeschen 1995, Katić 1995). U mleku zdravih krava prosečan broj somatskih ćelija iznosi oko 200 000/mL, dok je taj broj kod krava sa subkliničkim mastitisom značajno veći (Paape i sar., 2002). Broj somatskih ćelija raste sa starošću i stadijumom laktacije. Uticaj starosti, broja laktacija i stadijuma laktacije na broj somatskih ćelija (*SCC-somatic cell count*) opisan je od strane Cameron i Anderson (1993) i Schutz i sar. (1994). Sheldrake i sar. (1983) potvrđuju u svom istraživanju da mleko iz neinficiranih četvrti pokazuje manje promene u SCC u kasnijim laktacijama. Nikodemusz i sar. (1994) je utvrdio da maksimum SCC u mleku HF i mađarskog crvenog govečeta možemo očekivati u prvom i drugom mesecu laktacije, a da zatim dolazi do pada broja somatskih ćelija sve do 7. meseca kada se ponovo očekuje porast. Laevans i sar. (2007) izneli su podatak da prosečan broj somatskih ćelija raste sa starošću jedinke (pariteti). Primarni razlog nije starost već povećana sklonost ka infekcijama. Dohoo i Meek (1982) ističu da se

prosečan broj somatskih ćelija u zbirnom uzorku mleka povećava tokom letnjih meseci, što se poklapa sa većim procentom mastitisa tokom letnjeg perioda. Smith i sar. (1985) iznose pretpostavku da je stres usled visokih spoljnih temperatura i vlažnosti vazduha razlog povećanog broja mikroorganizama i samim tim i veće sklonosti ka infekciji mlečne žlezde. Povećan broj somatskih ćelija ukazuje na inflamatorne procese u mlečnoj žlezdi. Ovakve promene negativno utiču na kvalitet mleka smanjujući njegovu nutritivnu i tehnološku vrednost (Heeshen i Reichmuth, 1995). Prema Pravilniku o kvalitetu sirovog mleka (Sl. Glasnik RS, 21/09) dozvoljen broj somatskih ćelija u sirovom mleku je 400.000.

Broj somatskih ćelija kretao se od 31200 do 2307000 kod krava genotipa AA i od 28800 do 1030600 kod krava sa genotipom AB. Shapiro-Wilk-ov W test je ukazao da podaci ne slede model normalne raspodele ( $p_{AA} < 0,001$  i  $p_{AB} = 0,027$ ), pa je i pored homogenih varijansi (za Levene-ov test  $F = 0,844$ ;  $p = 0,361$ ) za utvrđivanje značajnosti razlike u prosečnom broju somatskih ćelija korišćen Mann-Whitney U test. Prema U testu ( $z = 0,095$ ;  $p = 0,924$ ) ukupan broj somatskih ćelija ne razlikuje se statistički značajno kod krava različitih genotipova. Transformacijom podataka za ukupan broj somatskih ćelija u promenljivu  $y = \log x$ , dobijeni su normalno distribuirani podaci sa homogenim varijansama na koje je primenjen t-test. I rezultati t-testa ( $t = 0,297$ ;  $p = 0,767$ ) su ukazali da razlika u prosečnom ukupnom broju somatskih ćelija kod krava genotipa AA i genotipa AB nije statistički značajna. Primetan je veći koeficijent varijacije kod krava AA genotipa (116,84%) u odnosu na krave AB genotipa (89,84%) ali je udeo krava sa SCC većim od 400 000 veći kod krava AB genotipa (37,5%) u odnosu na krave AA genotipa (27,03%). U rezultatima Wojdacz-Maksymiec i sar. (2006) statistički značajna razlika u SCC utvrđena je između genotipa AA i AB za LTF gen, pri čemu je broj somatskih ćelija (transformisan u log. skalu) veći kod krava AB genotipa u odnosu na krave AA genotipa. Sličan rezultat su dobili i Zielak-Steciwko i sar. (2014) koji su ispitali uticaj polimorfizma LTF gena na promene u odnosu proteinskih frakcija mleka i broj SCC kod autohtonne crveno bele i HF rase krava u Poljskoj. Pri tom je ustanovljena statistički značajna razlika u SCC, pri čemu su krave AB genotipa bile "opterećene" većim SCC u odnosu na krave AA genotipa. Do sličnih rezultata u svojim istraživanjima došao je i Zhao i sar. (2009). Sharifzadeh i Doosti (2011) pratili su ekspresiju i polimorfizam gena za laktoferin kod iranskih holštajn bikova pri čemu je

DNK ekstrahovana iz sperme. RFLP metodom ustanovljena je distribucija dve alelne forme (A i B) kroz tri moguća genotipa. Genotip AA je povezan sa smanjenom koncentracijom somatskih ćelija, a genotip AB je povezan sa povećanom koncentracijom somatskih ćelija. Takođe, primećeno je signifikantno povećanje heterozigotnih AB genotipova u populaciji. Nasuprot ovome, Colarado i sar. (2013) navode da je statistički značajna razlika u broju somatskih ćelija između 3 otkrivena genotipa (AA, AB i BB) u korist AB genotipa koji karakteriše najmanji broj SCC. Do sličnog zaključka dolaze i Doust i sar. (2014) koji u svom istraživanju ukazuju na distribuciju 2 alelne forme A i B u odnosu 0,85 prema 0,15. Ova dva alela kontrolisali su pojavu 2 od 3 moguća genotipa, AA i AB u odnosu 70,25% prema 29,75%. Nije ustanovljen BB genotip. Nakon statističke obrade ustanovljena je statistički značajna povezanost između LTF genotipa, broja laktacija i interakcija između genotipa i laktacije. Nije ustanovljena statistička značajnost između godišnjeg doba i broja SCC. Krave AA genotipa imale su veći broj SCC (transformisan u logaritamsku skalu) u odnosu na krave AB genotipa. Kod krava u drugoj laktaciji ustanovljen je veći broj SCC nego kod krava u drugim laktacijama. Iako u ovom istraživanju postoji varijabilnost u broju SCC kod AA i AB genotipa gledano u okviru svakog genotipa posebno i u odnosu jednog na drugi nije ustanovljena statistički značajna razlika u broju somatskih ćelija između dva praćena genotipa a razlog tome treba tražiti u velikom koeficijentu varijacije, veličini praćene populacije (Lee i sar., 2004, Chopra i sar., 2013). Na osnovu iznetih rezultata istraživanja različitih autora zapaža se da ne postoji konzistentnost i uniformnost u delu koji se odnosi na povezanost genotipova za LTF gen sa pojavom većeg broja somatskih ćelija u mleku. Korelacioni parametri ukazuju da je kod krava genotipa AA ustanovljena jaka negativna korelacija između SCC i koncentracije masti (-0,363, tabela 10.). Kod krava genotipa AB takođe postoji negativna korelacija (-0,341), (tabela 11.). Ovaj nalaz je u skladu sa nalazima Politis i Ng-Kwai-Hang (1998) koji navode da se sa povećanjem somatskih ćelija smanjuje koncentracija masti i kazeina u mleku. Harmon (1994) navodi da, usled poremećene sintetske aktivnosti mlečne žlezde do koje dolazi usled kliničkih ili supkliničkih infektivnih procesa na mlečnoj žlezdi, menja se i količina proteina, mlečne masti i laktoze u mleku. Do sličnih zaključaka došli su i Auldist i sar. (1996), Rajčević i sar. (2003). Diskriminaciona analiza (tabela 14.) je pokazala da postoji statistički značajna razlika između krava sa  $\leq 400.000$  somatskih

ćelija i krava sa  $>400.000$  ćelija u pogledu količine mlečne masti u mleku u korist krava sa manje od  $400.000$  somatskih ćelija ( $p < 0,001$ ). Gledajući pojedinačno po genotipovima (Tabela 15.) kod krava genotipa AA prisutna je statistički značajna razlika u količini mlečne masti između krava sa  $\leq 400.000$  SCC i krava sa  $>400.000$  SCC. Krave sa većim brojem SCC od dozvoljenog imaju statistički značajno nižu koncentraciju masti nego krave sa nižim brojem SCC. Sa druge strane, kod krava AB genotipa nije ustanovljena statistički značajna razlika u praćenim parametrima mleka između krava sa  $\leq 400\ 000$  SCC i krava sa  $\geq 400\ 000$  SCC. Ovaj rezultat nije u skladu sa istraživanjem Zielak-Steciwo i sar. (2014) koji navode da nema statistike značajnosti u koncentraciji mlečne masti kod krava AA genotipa sa  $\leq 400\ 000$  SCC i krava  $>400\ 000$  SCC, dok je kod krava genotipa AB ova značajnost prisutna.

## 7. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata u okviru ovog istraživanja došlo se do sledećih zaključaka:

1. U uzorku od 90 krava različitim brojem laktacija (1. do 4.) utvrđeno je postojanje 2 genotipa za laktoferin (LTF) gen AA i AB, dok genotip BB nije dokazan.
2. Dobijeni rezultati ukazuju na statističku razliku zastupljenosti genotipa AA (82,22%) u odnosu na genotip AB (17,78%) u praćenoj populaciji. Distribucija A alelne forme gena bila je značajno veća od B alelne forme.
3. Na osnovu Hardy-Weinberg jednačine genetičke ravnoteže populacije utvrđeno je da se praćena populacija nalazi u ravnoteži ( $p=0,3547$ ). Ovaj rezultat ukazuje na genetsku konzerviranost zapata usled odsustva protoka gena.
4. Dobijeni rezultati koji se odnose na kvalitativni sastav mleka i ukupnu mlečnost ukazuju da ne postoji statistička razlika u koncentraciji ukupnih proteina, mlečne masti i ukupne mlečnosti između posmatranih genotipova AA i AB. Ovaj rezultat pokazuje da ne postoji uticaj polimorfizma LTF gena na kvalitativni sastav mleka i mlečnost.
5. Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da između posmatranih genotipova postoje razlike u broju somatskih ćelija ali te razlike nisu statistički značajne.
6. Kod genotipa AA utvrđena je statistički značajna negativna korelacija između broja somatskih ćelija i koncentracije mlečne masti, zatim između starosti i koncentracije mlečne masti, kao i između proizvodnje mleka i koncentracije proteina.
7. Kod genotipa AB utvrđene su negativne korelacije između broja laktacija i mlečne masti, količine mlečne masti i ukupne proizvodnje mleka i broja somatskih ćelija i mlečne masti ali bez statističke značajnosti.
8. Rezultati diskriminacione analize za svaki genotip ukazuju na značajnu razliku u koncentraciji mlečne masti kod krava AA genotipa sa većim brojem somatskih ćelija ( $>400.000$ ) u odnosu na krave AB genotipa.

9. Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da polimorfizam gena za LTF ne može biti iskorišćen kao pouzdan marker u marker asistiranoj selekciji mlečnih krava otpornih na mastitis.

## 8. LITERATURA

1. Abrink M, Larsson E, Gobl A, Hellman L, 2000, Expression of lactoferrin in the kidney: implications for innate immunity and iron metabolism. *Kidney International*, 57, 2004–2010
2. Adams DR 1986, *Canine Anatomy a Sistemic Stady*. Ames. Iaowa State University Press.
3. Adlerova L, Bartoskova A, Faldyna M, 2008, Lactoferrin: a rewiew; *Veterinarni Medicina*, 53, 457-468
4. Anggraeni A, Mumpunie GE, Mibrianti R, 2013, Genetic polymorphism of the lactoferrin gene in the dairy and beef catlles at the national arteficial insemination and embryotransfer stations, *JITV*, 17, 251-257.
5. Andersson L 2001, Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. *Nat Rev Genet* 2, 130–138.
6. Arnold, R R, Russell JE, Champion WJ, Brewer M, and Gauthier JJ, 1982, Bactericidal activity of human lactoferrin: Differentiation from the stasis of iron deprivation. *Infect. Immun.* 35, 792-799.
7. Arnould VMR 2009, Genetic analysis of lactoferrin content in milk, *J Dairy Sci.* 92, 2151-2158
8. Auldist MJ, Hubble IB, 1998, Effects of mastitis on raw milk and dairy products, *Aust J Dairy Tech*, 53, 28-36.
9. Auldist MJ, Walsh BJ, & Thomson, NA, 1998, Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zealand. *J Dairy Res* 65, 401-11



10. Azevedo, ALS, Nascimento CS, Steinberg RS, Carvalho MRS, Peixoto MGCD, Teodoro RL, Verneque RS, Guimarães, SEF, Machado MA 2008, Genetic polymorphism of the kappa-casein gene in Brazilian cattle. *Genetics and Molecular Research* 7, 623-630.
11. Bačić G, 2009, Dijagnostika i liječenje mastitisa u goveda, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
12. Bagnicka E, Strzalkowska N, Flisikowski K, Szreder T, Jozwik A, Prusak J, Krzyewski J, Zwierzchowski, 2007, The polymorphism in the  $\beta$ -4 defensin gene and its association with production and somatic cell count in Holstein-Friesian cows; *J Anim Bred Genet* 124, 150-156.
13. Bagnicka E, Strzalkowska N, Jozwik A, Krzyewski J, Horbanczuk J, Zwierzchowski L, 2010, Expression and polymorphism of defensins in farm animals, *Acta Biochimica Polonica*, 57, 487-497
14. Bailey K, Jones CM, Heinrichs J, 2005, Economic returns to Holstein and Jersey herds under multiple component pricing, *J Dairy Sci*, 88, 2269-2280
15. Baker EN, (1994): Structure and reactivity of transferrins, *Advances in Inorganic Chemistry*, 41, 389–463
16. Bajwa IR, Khan MS, Khan MA, Gondal KZ, 2004, Environmental factors affecting milk yield and lactation length in Sahiwal cattle, *Pakistan Vet J*, 24, 23-27.
17. Baker, EN 2005, Lactoferrin: A multi-tasking protein par excellence. *Cell Mol Life Sci*, 62(22), 2592-2630
18. Baroni A, Donnarumma G, Paoletti I, Longanesi Cattani I, Bifulco K, Tufano MA, Cariero MV 2009, Antimicrobial human beta-defensin 2

stimulates migration , proliferation and tube formation of human umbilical vein endothelial cells, *Peptides* 30, 267-272

19. Baynes RD, Bezwoda WR 1994, Lactoferrin and the inflammatory response. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 357, 133–141
20. Bishop, JG, Schanbacher FL, Ferguson LC, and Smith KL, 1976, In vitro growth inhibition of mastitis-causing coliform bacteria by bovine apo-lactoferrin and reversal of inhibition by citrate and high concentrations of apo-lactoferrin, *Infect Immun* 14, 911-918.
21. Blangero J, Williams-Blangero S, Hixson, JE, 1992, Assessing the effects of candidate genes on quantitative traits in primate populations. *Am J Primat* 27, 119-132
22. Blank IH ,1953, Further observations on factors which influence the water content of the Stratum Corneum. *J Investigative Dermatol* 21, 259-271
23. Bojanić Mirjana (2000), Korelacija između promena u mleku i adhezije patogenih mikroorganizama za epitelne ćelije mlečne žlezde krave, Doktorska disertacija, Beograd.
24. Botstein D, Raymond L, Skolnick M, Davis R, 1980, Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphism, *Am J Hum Genet*, 32, 314-3312
25. Bramley, A J, Mastitis 1991, Physiology or pathology? New insights into the pathogenesis of mastitis. *Flem Vet J* 62, 1, 3-11.
26. Britigan, B. E., D. J. Hassett, G. M. Rosen, D. R. Hamill and M. S. Cohen. 1989. Neutrophil degranulation inhibits potential hydroxyl-radical formation. relative impact of myeloperoxidase and lactoferrin release on

- hydroxyl-radical production by iron-supplemented neutrophils assessed by spin-trapping techniques. *Biochem. J.* 264:447-455
27. Bullen JJ, Rogers HJ, Spalding PJ, Ward CG, 2005, Iron and infection: The heart of the matter, *FEMS Immunol Med Microbiol.*,43, 325-330
  28. Burrench CJ, Detilleux, Paape AM, Massart-Lee 2000, Physiological and genetic factors that influence the cow's resistance to mastitis, especially during early lactation. Symposium on Immunology of Ruminant mammary Gland. Proceedings, 9-20
  29. Cameron AR, Anderson GA 1993, Relationship between milk production and somatic cell count in dairy cows in East Gippsland, *Australian Veterinary Journal*,70, 13–17.
  30. Campros M, Godson D, Hughes H, Babink L. (1993): The role of Biological Response Modifiers in Disease Control. *J. Dairy Sci.* 76, 2407-2417
  31. Cergolj M, Tomašković A, Grizelj J, Prvanović N, Benić M, Curik I, Mačević N, Geci Z, 2004, Influence of close monitoring of dairy cows on the incidence of clinical and subclinical mastitis. 5TH Middle European Buiatric Congress, 2-5 June, Hajduszoboszlo, Hungary, 352-354
  32. Chaffer M, Leitner G, Winkler M, Glickman A, Krifucks O, Ezra E, Saran A (2000): Coagulase-negative staphylococci and mammary gland inflammation in cows. Symposium on Immunology of Ruminant Mammary Gland Proceedings, 331-37.
  33. Chopra A, Gupta ID, Verma A, Soumya NP, Vohra V, 2013, Identification of lactoferrin gene polymorphism and its association with mastitis incidence, *J Anim Res*, 103-105

34. Chrystal, M., Seykora A.J., Hansen, L.B. (1999) Heritabilities of teat and shape and teat diameter and their relationships with somatic cell score. *J. Dairy Sci.*, 82 2017-2022.
35. Chung S, Hayward C, Brock DJH., Van Heyningen V (1985): A monoclonal antibody-based immunoassay for human lactoferrin. *Journal of Immunological Methods*, 84, 135–141.
36. Close, M. J., A. R. Howlett, C. D. Roskelley, P. Y. Desprez, N. Bailey, B. Rowning, C. T. Teng, M. R. Stampfer, and P. Yaswen. 1997 Lactoferrin expression in mammary epithelial cells is mediated by changes in cell shape and actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 110:2861–2871
37. Concha (1986): Cell types and their immunological functions in bovine mammary tissues and secretion- a review of the literature. *Nord. Vet. Med.* 38
38. Conesa, C., L. Sanchez, C. Rota, M. D. Perez, M. Calvo, S. Farnaud and R. W. Evans. 2008. Isolation of lactoferrin from milk of different species: Calorimetric and antimicrobial studies. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 150:131-139
39. Colorado NR, Herrera AL, Zuluaga JE, 2012, Efecto del polimorfismo del intron 6 gen ltf bovino con algunas enfermedades de alta incidencia, *Rev Fac Nal Agr Med*, 65, 6439-6445
40. Conneely, OM, (2001) Antiinflammatory activities of lactoferrin. *J. Am. Coll. Nutr.* 20, 389-395
41. Coulon, JB, Verdier I, Pradel P, Almena, M 1998, Effect of lactation stage on the cheese making properties of milk and the quality of Saint-Nectaire-type cheese. *J Dairy Res* 65, 295-305

42. Cowie A, Forsyth A, Hart C. (1980): Hormonal Control of Lactation. Springer-Verlag; Berlin, Haidelberg, New York
43. Crouch, S. P., K. J. Slater and J. Fletcher. 1992. Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the iron-binding protein lactoferrin. Blood. 80:235-240
44. Diamond G., Zasloff M., Eck H., Brasseur M., Maloy WL., Bevins CJ. (1991): Tracheal antimicrobial peptide, a novel cystein-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: Peptide isolation and cloning of cDNA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 3952-3956
45. Dimitrijević V, Savić M, Trailović R, Petrujkić B, Simeunović P, Stevanović J, Stanimirović Z 2013, Molekularno genetički pristup individualnoj identifikaciji srndaća u slučaju krivolova u Srbiji. Vet glasnik 67 (3-4) 279-287.
46. Dohoo IR, Meek AH, 1982, Somatic cell counts in bovine Milk, The Canadian Veterinary Journal, 23, 119.
47. Doust H, Rahimi-Mianji G, Fargadi A, 2014, Association between bovine lactoferrin gene variant and somatic cell count in milk based on Eco RI restriction site, Iran J Vet Res, 62-65.
48. Ellison, R. T. and T. J. Giehl. 1991. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. J. Clin. Invest. 88:1080-1091
49. Ellison, RT, Giehl TJ, LaForce FM, (1988), Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. Infect. Immun. 56, 2774-2781
50. Erdei J, Forsgren A and Naidu AS, (1994) Lactoferrin binds to porins OmpF and OmpC in *Escherichia coli*. Infect. Immun. 62, 1236-1240

51. Frerking H., (1961): Yur Feststellung von Enterstörungen und Enterentzündungen in Vorzugsmilchbetrieben unter Verwendung geeigneter Laboratoriumsverfahren. Vet.med. Diss. Hanover
  
52. Furmanski P, Li ZP, Fortuna MB, Swamy CVB, Das MR (1989) Multiple molecular forms of human lactoferrin. Identification of a class of lactoferrins that possess ribonuclease activity and lack iron-binding capacity. The Journal of Experimental Medicine, 170, 415–429
  
53. Gajic B, Radulovic Z, Stevanovic J, Kulisic Z, Vucicevic M, Simeunovic P, Stanimirovic Z 2013, Variability of the honey bee mite *Varroa destructor* in Serbia based on mtDNA analysis. *Experimental and Applied Acarology* 61 (1) 97-105.
  
54. Ganz T. (2004) Defensins: antimicrobial peptides or vertebrates. C. R Biologies 32, 539-549.
  
55. Gaunt, SN, Raffio N, Kingsbury ET, Damon RA Jr, Johnson WH Mitchell BA 1980, Variation of lactoferrin and mastitis and their heritabilities, J Dairy Sci, 63, 1874-1880.
  
56. Glavinic U, Stevanovic J, Gajic B, Simeunovic P, Đuric S, Vejnovic B, Stanimirovic Z, 2014, *Nosema ceranae* DNA in honey bee haemolymph and honey bee mite *Varroa destructor*. *Acta Veterinaria* 64 (3) 349-357.
  
57. Goodman, RE, and Schanbacher FL 1991 Bovine lactoferrin mRNA: Sequence, analysis, and expression in the mammary gland. Biochem. Biophys. Res. Commun. 180 75-84.
  
58. Gonzalez-Chavez SA, Arevalo-Gallegos S, Rascon-Cruz Q, 2009, Lactoferrin: Structure, function and applications. Int. J. Antimicrob. Agents, 33, 301

59. Green MR, Pastewka JW, (1978): Lactoferrin is a marker for prolactin response in mouse mammary explants. *Endocrinology*, 103, 1510–1513
60. Groves ML, 1960, The isolation of a red protein from milk. *Journal of the American Chemical Society*, 82, 3345–3350
61. Gursel FE, Akis I, Ates A, Yardibi H, Turkay Hosturk, G, Oztabak K, 2013, EcoRI polymorphism in intron 6 of the bovine lactoferrin gene in South Anatolian Red and East Anatolian Red cattle breeds, *J Fak Vet Med Univ*, 39, 183-188.
62. Gvozdić D, Stojić V, Fratrić Natalija (2010): Mlečna žlezda krava. Naučni simpozijum Oboljenja mlečne žlezde, Divčibare, 14-17.10.2010. 3-18.
63. Hagiwara, S., K. Kawai, A. Anri, and H. Nagahata. 2003. Lactoferrin concentrations in milk from normal and subclinical mastitic cows. *J. Vet. Med. Sci.* 65:319–323
64. Hamann J (1987): The role of machine milking factors in the aetiology and pathogenesis of mastitis. *Hohenheimer arbeiten, Research on Milk production*, 22-56.
65. Hamann J (2000): Teat tissue resistance mechanisms with special regard to machine milking. *Symposium on Immunology of Ruminant mammary Gland, Proceedings*, 102-111.
66. Hancock JT., Salisbury V., Ovejero-Boglione MC., Cherry R., Hoare C., Eisenthal R et.al. (2002) Antimicrobial properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite, *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 3308-3310

67. Hancock R.E.W (1997): Peptide antibiotics, *Lancet*, 349, 418-422
68. Harmon, RJ, Newbould FSH, 1980. Neutrophil leukocyte as a source of lactoferrin in bovine milk. *Am. J. Vet. Res.* 41:1603
69. Hassanain N., Amin A.S. (2010): The Role of  $\beta$ -Defensins in the Immune Defense Against Bovine Mastitis, *Global Veterinaria*, 4, 631-635
70. Haversen, L., B. G. Ohlsson, M. Hahn-Zoric, L. A. Hanson and I. Mattsby-Baltzer, 2002, Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-kappa B. *Cell. Immunol.* 220:83-95
71. Heeshen WH, Reichmuth J, 1995, Mastitis: The disease under aspects of milk quality and hygiene, *Kieler Milchwirtschaftliche Forslungs Berichte*, 47, 217-237
72. Hibbitt KG., Graven N., Batten EH. (2004): Anatomy, Phziology and Immunology of the Udder, in Andrews HA, editor *Bovine medicine, diesaes and husbandry of cattle*. Blackwell Publishing Company, 311-325.
73. Hyoven P, 2010, Lactoferrin in Bovine Intramammary infection, Academic dissertation, Faculty of veterinary medicine, Helsinki.
74. Ivanković A, 2005, Uporaba molekularne genetike u animalnoj proizvodnji, *Stočarstvo*, 59, 121-144.
75. Iyer S, Lonnerdal B, (1993): Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism, *European Journal of Clinical Nutrition*, 47, 232–241
76. Javanmard A, Asadazadeh N, Banabazi MH, Tavakolian J, 2005, The allele and genotype frequencies of bovine pituitary specific transcription



factor and leptin genes in Iranian cattle and buffalo populations using PCR-RFLP. *Irianian J Biotechnol* 3, 104-108.

77. Jameson GB, Anderson BF, Norriss GE, Thomas DH, Baker EN (1998): Structure of human apolactoferrin at 2.0 Å resolution. Refinement and analysis of ligand-induced conformational change. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 54, 1319–1335
78. Jemmali B., Kamoun M., Ksouri M., Rekik B., Mhirs S., (2011): PCR-RFLP Analysis of Genetic Polymorphism of the Lactoferrin gene in Tunisian Imported Holsteins, *Wayamba Journal of Animal Science*.
79. Jensen RG, Ferris M, Carol JLK, 1991, The composition of milk fat, *J Dairy Sci*, 74, 3228-3243
80. Johanson B, 1960, Isolation of an iron containing red protein from human milk. *Acta Chemica Scandinavica*, 14, 510–512
81. Kamysz W., Okroj M., Lukasiak J. (2003): Novel properties of antimicrobial peptides, *Acta Biochimica Polonica* 50, 461-469
82. Kanyshkova TG, Buneva VN, Nevinsky GA 2001, Lactoferrin and its biological functions, *Biochemistry (Moscow)*, 66, 1-7
83. Katić Vera (2007a): Broj somatskih ćelija u oceni kvaliteta mleka, *Savremena poljoprivreda*, vol. 56; 33-41
84. Katić Vera (2007b): *Praktikum iz higijene mleka*, VKS Beograd
85. Katić Vera, Boboš S. (1990): Značaj preventivnih mera u suzbijanju mastitisa, *Veterinarski glasnik*, 3-4, 299-308

86. Katić Vera, Stojanović, L.(1998) :Broj somatskih ćelija u funkciji kvaliteta mleka. Radovi sa XII savetovanja agronoma,veterinara I tehnologa. Arandelovac, 395-403
  
87. Kikuchi M., Mizoroki S., Kubo T., Ohiwa Y., Kubota M., Yamada N., Orino K., Ohnami Y., Watanabe K. (2003): Seminal plasma lactoferrin but not transferrin reflects gonadal function in dogs. The Journal of Veterinary Medical Science, 65, 679–684
  
88. Klastrup N.O. (1985): Bovine mastitis. Definition and guidelines for diagnosis. Kieler Milchw. Forch. 3. 254-260.
  
89. Korhonen H, Kaartinen L, 1995, Changes in the composition of milk induced by mastitis, The bovine udder and mastitis, University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, 77-82.
  
90. Korhonen, H. 1995. Whey as raw material for development of new products for human nutrition and health; review.102:207-219. In milk in nutrition. Effects of production and processing factors. Nordisk Jordbruksforskarens förening. Report 102. pp. 327
  
91. Kos A, (2012) Validacija mikroskopske metode određivanja broja somatskih ćelija, specijalistički rad, Fakultet veterinarske medicine Beograd
  
92. Krol J, Brodziak A, Litwinzuk Z, Litwinzuk A, 2013, Effect of age and stage of lactation on whey protein content in milk of cows of different breeds, Polish J Vet Sci, 395-97
  
93. Krzyzowski J., Bagnicka Emilia, Strzalkowska Nina, Jozwik A., Pyzel Bozena, Zwierzchowski L (2008): Association between the polymorphism of bovine  $\beta$ -4 defensin gene and milk traits in Holstein-Friesien cows as

computed for standard (305 days) and whole lactation, Anim. Sci. Pap. Reports 26, 191-198

94. Kunze SR, Sordillo E, Jayarao BM, (2001): Application of differential inflammatory cell count as a tool to monitor udder health. J.Dairy Sci, 84,1313-1420.
95. Kušec, G. (2007.) poglavlje 7: Genomika svinja. U knjizi: Kralik, G., Kušec, G., Kralik, D., Margeta, V.:Svinjogojstvo: biološki i zootehnički princip
96. Laevens H, Deluyker H, Schukken YH, De Meulemeester L, Vandermeersch R, De Muelenaere E, De Kruif A (1997), Influence of parity and stage of lactation on the somatic cell count in bacteriologically negative dairy cows, J Dairy Sci, 80: 3219-3226
97. Lai Y., Gallo RL. (2009): AMPed up immunity: How antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense, Trends immunol. 30, 131-141
98. Lee C., Wooding FBP, Kemp P. (1980): Identification, propertie, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cove secretions, colostrum and milk from normal cows. J. Dairy Res. 47, 39-50
99. Lee TH, Shimizaki K, Yu SC, Nam MS, Kim SJ, Lee KK, Yu DY, 1997 Polymorphic sequence of Krean native goat lactoferrin exhibiting greater antibacterial acitivity, Anim Genet, 28, 367-9.
100. Legrand D., Ellass E., Pierce A., Mazurier J. (2004): Lactoferrin and host defence: on overview of its immune-modulating and anti-inflammarory properties, Biometals, 17,225-229.

101. Leitner G, Chaffer M, Krifucks O, Glickamn A, ezra E, Saran A (1999): Milk leukocyte population in heifers free of udder infection. J. Vet. Med. B47, 133-38.
102. Leitner G., Yadlin B., Glickman A., Chaffer M., Saran A (2000): Systemic and local immune response of cows to intramammary infection with *Staphylococcus aureus*. Res Vet Sci.69 (2):181-4.
103. Levay PF, Viljoen M, 1995, Lactoferrin: a general review, Haematologica, 80, 252–267
104. Liang QL, Zhou K., He HX. (2010): Retrocyclin 2: new therapy against avian influenza H5N1 virus *in vivo* and *in vitro*, Biotechnol. Lett. 32, 387-392
105. Lin J, Hogan JS, Smith KL, 1999, Antigenic homology of the inducible ferric citrate receptor (FecA) of coliform bacteria isolated from herds with naturally occurring bovine intramammary infections, Clin Diagn Lab Immunol, 6, 966-969.
106. Lin, J, Hogan JS, Smith KL, 1998, Inhibition of *in vitro* growth of coliform bacteria by a monoclonal antibody directed against ferric enterobactin receptor FepA J Dairy Sci, 81, 1267-1274.
107. Linzell JL, Peaker M, 1971, Mechanism of Milk Secretion. Physiological Reviews 51, 564-597.
108. Lonnerdal B, Iyer S, (1995): Lactoferrin: molecular structure and biological function. Annual Review of Nutrition, 15, 93–110
109. Machnicki, M., M. Zimecki and T. Zagulski. 1993. Lactoferrin regulates the release of tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 *in vivo*. Int. J. Exp. Pathol. 74:433-439.

110. Mackle TR, Bryant AM, Petch SF, Hooper RJ, Auldist MJ, 1999, Variation in the composition of milk protein from pasture-fed dairy cows in late lactation and the effect of grain and silage supplementation. *New Zealand J Agricult Res* 42, 147-54
111. Maletić M, Vakanjac S, Đelić N, Lakić N, Pavlović M, Nedić S, Stanimirović Z, 2013, Analysis of lactoferrin gene polymorphism and its association to milk quality and mammary gland health in Holstein-Friesian cows, *Acta vet* 63 (5-6) 487-498.
112. Marković B, 1982, Bolesti vimena domaćih životinja, Naučna knjiga, Beograd
113. Masson PL, Heremans JF, Schonke E (1969): Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 130, 643–658.
114. Mazurier J, Spik G 1980, Comparative study of the iron-binding properties of human transferrins. I. Complete and sequential iron saturation and desaturation of the lactotransferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 629, 399–408
115. Mc Donald JS, Anderson AJ (1981): Total and differential somatic cell counts in secretion from noninfected bovine mammary glands: the periparturient period. *Am. j. Vet. Res.* 42.1366-8.
116. Mehrzad J, Zhao X (2008): T lymphocyte proliferative capacity and CD4+/CD8+ ratio in primiparous and pluriparous lactating cows. *J. Dairy. Res.* 75.457-65.

117. Metz-Boutique MH, Jolles J, Mazurier J, Schoentgen F, Legrand D, Spik G, Montreuil J, Jolles P (1984): Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *European Journal of Biochemistry*, 145, 659–676
118. Mihajlović B. (1983): *Mikrobiologija I*, Veterinarski fakultet, Naučna knjiga, Beograd
119. Miljković V, 1977, *Higijena i tehnologija mleka*, Naučna knjiga, Beograd.
120. Molkentin J 1999, Bioactive Lipids Naturally Occurring in Bovine Milk, *Nahrung-Food* 43, 185-189.
121. Montreuil J, Tonnelat J, Mullet S, 1960, Preparation and properties of lactosiderophilin (lactotransferrin) of human milk, *Biochimica et Biophysica Acta*, 45, 413–421
122. Moore, S. A., B. F. Anderson, C. R. Groom, M. Haridas and E. N. Baker. 1997. Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 274:222-236.
123. Mrode RA, Swanson GJT (1996): Genetic and statistical properties of somatic cell counts and its suitability as an indirect means of reducing the incidence of mastitis in dairy cattle. *Animal Breeding Abstracts*, 64, 847.
124. Nanei A. H., Edris Ali-M., Mahyari A.S., Rahmani R-H., Tabatabaei B. (2012): Lactoferrin Gene Polymorphism of Holstein Cows in Isfahan Province, *Annals of biological researches*, 3; 2365-2367
125. Nava GM., Escorcia M., Canteneda MP (2009): Molecular diversity of the antimicrobial domain of beta-defensin 3 and homologous peptides, *Comparative Funct. Genomics*, volume 2009, article ID 983636, 8 pages

126. Nelson KG, Takahashi T., Bossert NL, Walmer DK, McLachlan JA (1991): Epidermal growth factor replaces estrogen in the stimulation of female genital-tract growth and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 21–25
127. Ng-Kwai-Hang KF, Hayes JF, Moxley JE, 1987, Variation in milk protein concentrations associated with genetic polymorphism and environmental factors. *J Dairy Sci* 70, 563-70
128. Nickerson S.C. (1985): Immune mechanisms of the bovine udder an overview. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* Jul.1. 187 (1), 41-45.
129. Nikodemusz E, Bedo S, Pickler A, Szep P (1994), Variations in milk somatic cell count and haematologic values of dairy cows during lactation. *Acta Veterinaria Hungarica*, 42, 131–139
130. Brien B, Fitzpatrick C, MeaneyWJ, Jozce P (1999): Relationship between somatic cell count and neutrophils in milk. *Ir. J. agr. Food Res.* 38, 288.
131. Halloran F., Bahar B., Buckley F., O Sullivan O., Sweeney T., Giblin L. (2009): Characterisation of single nucleotide polymorphisms identified in the bovine lactoferrin gene sequences across a range of dairy cow breeds, *Biochimie* 91, 68-75
132. O'Brien B, Mehra R, Connolly JF, Harrington D, 1999, Seasonal variation in the composition of Irish manufacturing and retail milks 1. Chemical composition and renneting properties. *Irish J Agric Food Res* 38, 53-64

133. Ogorevc J., Kunej T., Razpet A., Dovc P. (2009) Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis, *Animal Genetics*, vol. 40, 832-857.
134. Oliver SP, F. Weihuan, Almeida RA (2000): Lactoferrin is involved in increased adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells, *Symposium on Immunology of Ruminant mammary Gland, Proceedings*, 240-246
135. Oram, J. D. and B. Reiter. 1968. Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents. *Biochim. Biophys. Acta.* 170:351-365
136. Ostensen S, Foldager J, Hermansen JE, 1997, Effects of stage of lactation, milk protein genotype and body condition at calving on protein composition and renneting properties of bovine milk. *J Dairy Res*, 64, 207-19.
137. Owen J.B., Axford R.F.E. Bishop S.C. (1999) Mastitis in Dairy Cattle. In: *Breeding for Disease Resistance in Farm Animal*, 2nd Edition (Axford, R.F.E., S.C.Bishop, F.W. Nicholas, J.B. Owen, Eds.) CABI Publishing, UK, Wallingford, 243-252.
138. Pankey JW (1984): Uptake of postmilking teat antisepsis. *J. Dairy Sci.* 67, 1336-1353
139. Park HY, Fox LK, Hamilton MJ, Davis WC (1992): Bovine mononuclear leukocytes subpopulation in peripheral blood and mammary gland secretion during lactation. *J. Dairy Sci.* 75, 998-1006
140. Parodi PW, 1997, Cows' Milk Fat Components as Potential Anticarcinogenic Agents, *The Journal of Nutrition* 127, 1055-1060



141. Patill A., Hughes A.L., Zhang G. (2004): Rapid evolution and diversification of mammalian  $\alpha$ -defensins of rodent and primate genes, *Physiol Genomics*; 20, 1-11
142. Pawlik A., Sender G., Korwin-Kosakowska A. (2009): Bovine lactoferrin gene polymorphism and expresion in relation to mastitis resistance-rewiew, *Anim. Sci. Pap. Rep.* 27, 263-271
143. Petrović MB, Skalicki Z, Petrović MM, Bogdanović V, 2009, The effect of systematic factors on milk yield in Simental cows over complete lactations, *Biotech Anim Hausb*, 25, 61-71.
144. Pighetti G.M, Elliott A.A. (2012) Gene polymorphisms: the keysfor marker assisted selection and unraveling core regulatory pathways for mastitis resistance, *J. Mam. Gl. Bio. Neo.*, 421-432
145. Pillai SR., Kunze E., Sordillo LM., Jayarao BM. (2001): Application of differential inflammatory cell count as a tool to monitor udder health. *J.Dairy Sci*, 84,1313-1420.
146. Politis I, Ng-Kwai-Hang KF, 1988, Association between somatic cell counts of milk and cheese yielding capacity, *J Dairy Sci*, 71, 1720-1727
147. Pravilnik o kvalitetu sirovog mleka, Službeni glasnik Republike Srbije, 21/09
148. Pryce J.E., Esslemont R.J., Thompson R., Verkamp R.F., Kossaibati M.A., Simm G. (1998) Estimation of genetic parameters using healt, fertility and production data from a management for dairy cattle, *Animal Science*, 66, 577-584
149. Puddu P., Valenti P., Gessani S. (2009): Immunomodulatory effects of lactoferrin on antigen presenting cells, *Biochimie* 91, 11-18

150. Raab W, 1990, Skin cleansing in health and disease. Wien Med Wochenschr, 17, (suppl.108), 4.
151. Rainrad P., Poutrel B. (1995): Deposition of complement component on *Streptococcus agalactiae* in bovine milk in the absence in inflammation. Infect. Immun. 63, 3422-27.
152. Reinard JHD (1983): Experimental mastitis with *Escherichia coli*: kinetics of bacteriostatic and bactericidal activities. Ann. Rech. Vet.14, 01-11
153. Rogers, G.W., Hargrove, G.L., Cooper L.B. (1991) Corelations among somatic-cell scores of milk within and across lactations and linear type traits of Jerseys. J.Dairy Sci. 78 914-920
154. Rumke P, Visser D, Kwa HG, Hart AA (1971): Radio-immuno assay of lactoferrin in blood plasma of breast cancer patients, lactating and normal women; prevention of false high levels caused by leakage from neutrophile leucocytes *in vitro*. Folia Medica Neerlandica, 14, 156–168.
155. Ryan LK., Rhodes J., Bhat M., Diamond G (1998): Expression of beta-defensin genes in bovine alveolar macrophages, Infect. Immun 66: 878-881
156. Ryniewicz Z., Zwierzchowski I., Bagnicka E., Flisikowski K., Maj A., Krzyzewski J., Strzalowska N. (2003): association of the polymorphism at defensin gene loci with dairy production traits and milk somatic cell count in Black-and White cows, Anim. Sci. Pap. Rep, 21, 209-222
157. Saad AM, Concha C, Astrom G (1989): Alterations in neutrophil phagocytosis and lymphocyte blastogenesis indairly cows around parturition. Zentr. Vet. Med. B36, 337-45.

158. Sanchez L., Aranda P., Perez MD., Calvo M.1988: Consentration of lactoferin and transferin throughout lactation in cows colostrums and milk. Biol. Chem. Hoppe Seyler, 369,1005-1008.
159. Sandholm M., Matilla T. (1986): Milk N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAGase) as an indicator for bovine mastitis. Symposium on mastitis control and hygienic production of milk. Espoo, Finland, 153-161
160. Santos MV, Ma Y, Barbano DB, 2003, Effect of somatic cell count on proteolysis and lypolysis in pasteuriezd fluid milk during shelf-life storage, J. Dairiy Sci, 86, 2491-2503
161. Sanz A, Ordovás L, Serrano C, Zaragoza P, Altarriba J, Rodellar C (2010) A single nucleotide polymorphism in the coding region of bovine transferrin is associated with milk fat yield. Genet Mol Res 9(2), 843-848
162. Schaar J, 1984, Effects of  $\kappa$ -casein genetic variants and lactation number on the renneting properties of individual milks. J Dairy Res 51, 397-406
163. Schanbacher, FL, Goodman RE, Talhouk RS, 1993, Bovine mammary lactoferrin: Implications from messenger ribonucleic acid (mRNA) sequence and regulation contrary to other milk proteins, J Dairy Sci, 76, 3812-3831
164. Schalm OW. (1971): Bovine mastitis. Philadelphia, USA
165. Schuster D.E., Kchrli M.E., Rainard P, Paape M. (1997): Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrofilic recruitment during intramammamary infection with E. coli. Infect. Immun. 65, 3286-92
166. Scott PH (1989): Enzyme immunoassay of lactoferrin in newborn term infants: reference values and influence of diet. Annals of Clinical Biochemistry, 26, 407–411

167. Schryvers AB, Morris LJ, 1988, Identification and characterization of the human lactoferrin-binding protein from *Neisseria meningitidis*, Infect Immun, 56, 1144-1149.
168. Selsted ME., Tang YQ., Morris WL., Mc Guire PA., Novotny MJ., Smith W., Hencshen AH., Cullor JS (1993): Purification, primary structures and antibacterial activities of beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils, J. Biol. Chem, 268: 6641-6648
169. Sender G. (1986): Threshold value of somatic cell count in udder total milk. Proceedings of Symposium on mastitis control and hygienic production of milk. Espoo, Finland, 147-153.
170. Sender Grazyna, Pawlik Adriana, Kossarkowa Agnieszka, Abdel Galal K., Sobczynska Magdalena, Oprzadek J. Prusak B. (2010) : Association of bovine lactoferrin gene polymorphism with occurrence of mastitis, Milchwissenschaft 65, 242-245
171. Seyfert, H.M., Kuhn, C. (1994) Characterization of a first bovine lactoferrin gene variant, based on an EcoRI polymorphism, Anim. Genet., 25, 54
172. Sharifzadeh A., Doosti A. (2011): Study of Lactoferrin Polymorphism in Iranian Holstein Cattle Using PCR-RFLP Technique, Global Veterinaria 6, 530-536
173. Shepers A.J., Lam T.J.G.M., Schukken Y.H., Wilmink J.B.M. and Hanekamp W.J.A. (1997): Estimation of Variance Components for Somatic Cell Counts to Determine Thresholds for Uninfected Quarters. J. Dairy Sci. 80, 1833-184

174. Shutz M.M. (1994) Genetic evaluation of somatic cell scores for United-States dairy cattle. J. Dairy Sci. 77 2113-2129.
175. Schmitt B, Henderson L, 2005, Diagnostic tools for animal diseases, Rev Sci Tech Off Int Epiz, 24, 243-250.
176. Soldatović B, Stanimirović Z, Vučinić M, Đokić D, Vučićević M, 1993, A mosaicism with karyotype designation of 59, XO/60, XX/61, XXX in red pied heifer (part III), Acta Vet, 43, 335-340
177. Soldatović B, Stanimirović Z, Vučinić M, Đokić D, Vučićević M, 1994a, Robertsonian fusion in simmental cow bull-mother (part II), Acta vet, 44, 173-178
178. Soldatović B, Stanimirović Z, Vučinić M, Đokić D, Vučićević M, 1994b, The aberrant karyotype of a bull with characteristic of Klinefelter's syndrome, (part I), Acta Vet, 44, 33-36
179. Sordillo LM, Streicher KL (2002): Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia, 7, 135-46
180. Stanimirović Z, Stevanović J, 2012, Primena molekularno-genetičkih analiza u veterinarskoj medicini, Zbornik predavanja XXXIII Inovacija znanja veterinara, 17-33.
181. Stevanovic J, Stanimirovic Z, Dimitrijevic V, Maletic M, 2010, Evaluation of 11 microsatellite loci for their use in paternity testing in the Yugoslav Pied cattle (YU Simmental cattle). Czech J. Anim. Sci. 55, 221-226.
182. Stevanovic J, Stanimirovic Z, Genersch E, Kovacevic RS, Ljubenkovic J, Radakovic M, Aleksic N, 2011, Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie*, 42, (1) 49-58.

183. Stojić V. (1999): Fiziologija. Naučna knjiga, Beograd
184. Stojić V., Gvozdić D. (2001): Fiziologija i patofiziologija imunosti mlečne žlezde. Simpozijum "Mastitis i kvalitet mleka", Vrnjačka Banja
185. Stumpf and Welch. 2004. Secretory and defensive functions of the duct system of the lactating mammary gland of the African elephant (*Loxodonta africana, proboscidea*). Zoomorphology. 123:155-167.
186. Suzuki YA, Lonnerdal B, (2002): Characterization of mammalian receptors for lactoferrin. Biochemistry and Cell Biology, 80, 75–80.
187. Suzuki YA, Lopez V., Lonnerdal B. (2005): Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. Cellular and Molecular Life Sciences, 62, 2560–2575
188. Sykes JA, Thomas MJ, Goldie DJ, Turner GM, 1982, Plasma lactoferrin levels in pregnancy and cystic fibrosis, Clinica Chimica Acta, 122, 385–393
189. Swaisgood, H. E. 1992. Chemistry of the caseins. P. 63-110 in In. ADV. Dairy Chem. Vol. 1. Proteins. Chemistry of the caseins. Elsevier Applied Science, Canbridge
190. Sykes JA, Thomas MJ, Goldie DJ, Turner GM (1982): Plasma lactoferrin levels in pregnancy and cystic fibrosis. Clinica Chimica Acta, 122, 385–393
191. Szewczuk M, Zych S 2012 Association between IGF1R / i16 / TaqI and IGF1 / SnaBI polymorphisms and milk production traits in Polish Holstein-Friesian cows. Anim Sci Pap Rep 30(1), 13-24

192. Šijački N., Jablan Pantić Olivera, Pantić V. (1997): Morfologija domaćih životinja. Beograd, 224-228.
193. Tambasco DD, Alencar MM, Coutinho LL, Tambasco AJ, 2000, Caracterizacao molecular de animais da raca Nelore utilizando microsatelites e genes candidatos, Rev. Bras Zoot, 29, 1044-1049
194. Tang YQ., Zuan J., Osapay K., Tran D., Miller CJ., Outlette AJ., Selsted ME (1999): A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leucocytes by the ligation of two truncated alpha-defensin, Science, 286; 489-502
195. Teng, C. T. 2002. Lactoferrin gene expression and regulation: An overview. Biochem. Cell Biol. 80:7–16
196. Tizard RI. (1996): Veterinary Immunology. ISBN0-7216-5772-9
197. Tsuji, S., Y. Hirata, F. Mukai, and S. Ohtagaki. 1990. Comparison of lactoferrin content in colostrum between different cattle breeds. J. Dairy Sci. 73:125–128
198. Utrera AR, Calderon Rubles RC, Galaviz-Rodriguez JR, Vega-Murilo VE, Lagunes JL, 2013, Effects of breed, calving season and efficiency of dairy cows under subtropical conditions, Int J Anim Vet Adv, 5, 226-232
199. Vakanjac Slobodanka., Pavlović M., Pavlović V., Obrenović Sonja: (2008): Immunoprophylaxis *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows. Acta Veterinaria 58,2-,221-230.
200. Valenti P, Antonini G, (2005): Lactoferrin: an important host defense against microbial and viral attack. Cellular and Molecular Life Sciences, 62, 2576–2587
201. Vandenputte-Van M, Bernabe G, Burvenich C, Peeters G, 1982, Effect of  $\beta$ -Blocking Agents on the teat motility in lactating cows. Arch. Intern. Pharmacodyn. 260, 309-311.

202. Vangrofenwenhe F, Dosonge H, Burvenich C, 2002, Composition and milk cell Characteristics in quarter milk fractions of dairy cows with low cell count, *Vet. Journal*, 164, 254-60
203. Vasconcellos LPMK, Tambasco DD, Pereira AP, 2003, Genetic characterization of Aberdeen Angus cattle using molecular markers, *Genet Mol Biol*, 26, 133-137.
204. Verdi RJ, Barbano, DM, Dellavalle ME, Senyk GF, 1987, Variability in true protein, casein, nonprotein nitrogen and proteolysis in high and low somatic-cell milks. *J Dairy Sci* 70, 230-42
205. Vučićević M, Stevanov-Pavlović M, Stevanović J, Bošnjak J, Gajić B, Aleksić N, Stanimirović Z, 2012, Sex determination in 58 bird species and evaluation of CHD gene as a universal molecular marker in bird sexing, *Zoo biol*,
206. Uffo O, Acosta A, 2009, Molecular diagnosis and control strategies for the relevant genetic diseases of cattle, *Biotechnologia Aplicada* 26, 204-208
207. Ward PP, Zhou X, Conneely OM, 1996, Cooperative interactions between the amino- a carboxyl-terminal lobes contribute to the unique iron-binding stability of lactoferrin. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 12790–12794
208. Welty, FK, Smith KL, Schanbacher FL, 1976, Lactoferrin concentration during involution of the bovine mammary gland, *J Dairy Sci*, 59, 224-231.
209. Wiechula BE, Tustanowski JP, Martirosain G, 2006, Antimicrobial peptides , *Wiad Lek*; 59, 542-547
210. Wilton JW, Van Vleck LD, Evertt RW, Guthrie RS, Roberts SJ (1972): Genetic and enviromental aspects of udder infections, *J.Dairy Sci*, 55,183-93.



211. Wojdak-Maksymiec K., Kmiec M., Ziemak J. (2006): Associations between bovine lactoferrin gene polymorphism and somatic cell count in milk, *Veterinarni Medicina*, 51, 14-20.
212. Wojdak-Maksymiec K., Strabel T., Szyda J., Mikolajczyk (2012): Clinical Mastitis and Combined Defensin Polymorphism in Dairy Catlle, *J. Anim.Vet. Adv.* 11, 2230-2237.
213. Zagulski, TP, Lipinski A, Zagulska S, Broniek and Jarzabek Z, 1989. Lactoferrin can protect mice against a lethal dose of *Escherichia coli* in experimental infection in vivo. *Br. J. Exp. Pathol.* 70,697-704
214. Zhao C.H., G. M. He, Y. Wang i Z. Zhang (2008): Polymorphism analysis of the promoter of cow lactoferin gene with PCR-RFLP and itd corelation with subclinical mastitis, *Acta agriculturae Slovenica* 92, 185-187
215. Zhao C.H., Gaoming H. Wang Y., Zhang Z. (2009): Polymorphism of lactoferrin gene and its asocciation with subclinical mastitis in dairy cows, *Modern Aplied Science*, vol. 3 No. 2., 114-146.
216. Zheng, J., J. L. Ather, T. S. Sonstegard, and D. E. Kerr. 2005, Characterization of the infection-responsive bovine lactoferrin promoter. *Gene* 353, 107–117.
217. Zielak- Steciwko A, Pecka E, Kesek M, Kuczaj M, Szulc T, 2014, Changes in the proportion of proteins fractions, deepending on lactoferrin polymorphism gene and the somatic cell count in the milk of Polisch Holstein Friesian and Polisch Red White catlle, *Vet Med Zoot*, 66, 83-89
218. Yamauchi K, Tomita M, Giehl TJ, Ellison RT 1993, Antibacterial activity of lactoferrin and pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infection and Immunity*, 61, 719–728.

## BIOGRAFSKI PODACI

Milana Maletića

Rođen je 15. 08. 1982. godine u Šapcu. Odrastao je u Bogatiću gde je završio Osnovnu školu „Mika Mitrović“, kao i srednju veterinarsku školu „7. avgust“, kao đak generacije. Školske 2001/2002 godine upisuje Fakultet veterinarske medicine koji uspešno završava u februaru 2008. godine sa prosečnom ocenom 9.52. Tri godine je bio stipendista fondacije „Dragoljub Marinković“ kojom upravlja Rektorat Univerziteta u Beogradu. U septembru 2009. godine Rektorat Univerziteta u Beogradu dodeljuje mu povelju namenjenu najbolje diplomiranom studentu Fakulteta veterinarske medicine u školskoj 2007/2008. godini. Po završenom fakultetu proveo je nekoliko meseci u laboratoriji za genetiku Fakulteta veterinarske medicine gde se upoznao sa osnovama genetičko-molekularnih metoda i gde je učestvovao kao koautor u izradi nekoliko stručnih i naučnih radova. Od septembra 2008. godine aktivno je uključen u poslove vezane za praktičnu nastavu, a od 1.11.2010 zaposlen je na Katedri za porodiljstvo, sterilitet i v.o. kao asistent gde se nalazi i danas. Novembra 2008. godine upisuje se na doktorske studije. Iste godine postaje prvo stipendista Fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka, a zatim i Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Učestvuje kao istraživač-doktorant na projektu br. 20011 „Uvođenje molekularno-genetičkih markera za utvrđivanje roditeljstva i proizvodnih osobina u funkciji selekcije i oplemenjivanja goveda“ pod rukovodstvom prof. dr Zorana Stanimirovića. Objavio je do sada kao autor i koautor 23 naučna i stručna rada od toga 1 rad kategorije M 22, 4 rad kategorije M 23, 1 rad kategorije M 24, 2 rada kategorije M 33, 1 rad kategorije M 34, 1 rad kategorije M 61 i 20 radova kategorije M 63. Proveo je 2 nedelje u septembru mesecu 2011. godine na Klinici za farmske životinje Fakulteta veterinarske medicine u Budimpešti. Trenutno je uključen kao saradnik na projektu interdisciplinarnih istraživanja III 46002 : Molekularno-genetička i ekofiziološka istraživanja u zaštiti autohtonih animalnih genetičkih resursa, očuvanju dobrobiti, zdravlja i reprodukcije gajenih životinja i proizvodnji bezbedne hrane“ sa 8 istraživačkih meseci. Rukovodilac projekta je prof.dr Zoran Stanimirović. Položio je sve ispite na doktorskim studijama sa prosečnom ocenom 9,67. Oženjen Jelenom, otac Lenke i Mile.

Prilog 1. Izjava o autorstvu

Potpisani **Milan Maletić**

broj indeksa 15/4

Izjavljujem

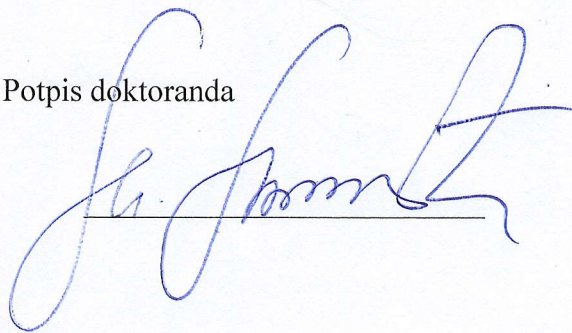
da je doktorska disertacija pod naslovom:

**Analiza povezanosti polimorfizma gena za laktoferin (LTF) sa zdravljem mlečne žlezde i proizvodnim karakteristikama krava holštajn-frizijske rase**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu,  
24. 06. 2015.

Potpis doktoranda





Prilog 2. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: **Milan Maletić**

Broj indeksa: 15/4

Studijski program doktorske studije

Naslov rada: **Analiza povezanosti polimorfizma gena za laktoferin (LTF) sa zdravljem mlečne žlezde i proizvodnim karakteristikama krava holštajn-frizijske rase**

Mentor: prof. dr Zoran Stanimirović (mentor 1), prof. dr Slobodanka Vakanjac (mentor 2)

Potpisani: **Milan Maletić**

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

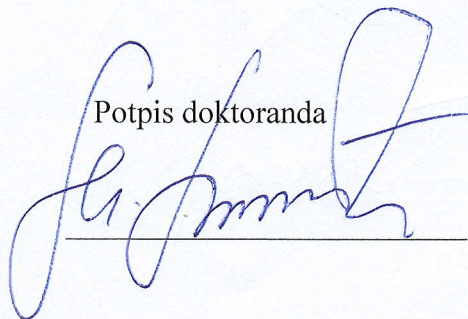
Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu,

24. 06. 2015.

Potpis doktoranda





Prilog 3. Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**Analiza povezanosti polimorfizma gena za laktoferin (LTF) sa zdravljem mlečne žlezde i proizvodnim karakteristikama krava holštajn-frizijske rase**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
- ☒ 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Beogradu,  
24. 06. 2015.

Potpis doktoranda

