

3
4
5 IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

6
7 I PODACI O KOMISIJI:

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

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

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

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

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

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

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

29
30 II PODACI O KANDIDATU:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

41 42 1.1. Rezultati CM testa

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

48 49 1.2. Rezultati mikrobiološkog ispitivanja uzoraka mleka

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

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

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

6 1.3. Rezultati određivanja broja somatskih ćelija

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

15 2. Rezultati ispitivanja hematološkog profila nakon terapije vitaminom C

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

8 VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:
9

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

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

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

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

27 IX PREDLOG:
28

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

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

33 DATUM

34 23.02.2016.

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

MENTOR:

Dr Miodrag Lazarević, redovni profesor, FVM, Beograd
37
38
39

40 _____
41
42 ČLANOVI KOMISIJE:

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

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

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

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