

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ

Милица В. Стојић

**УТИЦАЈ ПЕРОРАЛНОГ ДАВАЊА
ОРГАНСКИ МОДИФИКОВАНОГ
КЛИНОПТИЛОЛИТА НА КВАЛИТЕТ
КОЛОСТРУМА ПРВОТЕЛКИ**

Докторска дисертација

Београд, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Milica V. Stojić

**THE EFFECT OF ORAL
ADMINISTRATION OF ORGANICALLY
MODIFIED CLINOPTILOLITE ON
COLOSTRUM QUALITY IN
PRIMIPAROUS DAIRY COWS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018.

Ментор:

Др Наталија Фратрић, редовни професор
Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду

Чланови комисије:

Др Драган Гвоздић, редовни професор
Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду

Др Весна Илић, научни саветник
Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду

Датум одбране: _____

Највећу захвалност дугујем својој менторки проф. др Наталији Фратрић на великој подршци при одабиру проблематике и теме за израду ове докторске дисертације. Њено велико искуство у експерименталном раду, уложени труд, знање и енергија су били од непроцењиве користи.

Неизмерну захвалност дугујем проф. др Драгану Гвоздићу на драгоцену помоћи приликом статистичке обраде података и приказа резултата као и на пажљивом читању и корисним сугестијама током писања овог рада.

Посебну захвалност дугујем др Весни Илић, научном саветнику на Институту за медицинска истраживања, на свесрдној помоћи и подршци током израде и писања ове тезе, чији аналитички дух и непроцењиви савети и сугестије су помогли да се ова теза уради што боље и темељније.

Захваљујем се колективу Катедре за физиологију и биохемију на помоћи и разумевању приликом израде ове тезе, и колегама са Катедре за хигијену и технологију намирница анималног порекла који су ми пружили могућност да део анализа урадим у њиховој лабораторији. Захваљујем се и колегама са Института за трансфузију крви где је био спроведен део лабораторијских анализа.

Захваљујем се колегиници Маријани Ковачић са Института за медицинска истраживања на несебичној стручној помоћи и пружању нових знања и вештина у лабораторијском раду.

Захваљујем се колегама са фарме „Падинска Скела“ који су омогућили да се оглед спроведе на њиховој фарми. Велику помоћ током извођења огледа на фарми пружале су ми колеге са основних студија Лазо Бабић, Љубомир Јовановић и Звездан Гагић, којима дугујем бескрајну захвалност.

Велику захвалност дугујем фирми Patent Co., на указаном поверењу и сваком облику подршке и помоћи без које израда ове докторске дисертације не би била остварена.

И на крају, велико хвала мом оцу, мојој породици и пријатељима на бескрајном стрпљењу и подршци за успешан завршетак ове докторске дисертације.

Утицај пероралног давања органски модификованог клиноптилолита на квалитет колострума првотелки

КРАТАК САДРЖАЈ

За здравље и преживљавање новорођене теладии од највећег значаја је уношење адекватне количине колострума доброг квалитета одмах после рођења. Поред своје функције као основног извора нутритијената, колострум има есенцијалну функцију у обезбеђивању имунске заштите телета у раним фазама живота. Исхрана колострумом високог квалитета у првим сатима живота обезбеђује теле са довољном количином имуноглобулина неопходних за успостављање пасивног имунитета током прва три месеца живота.

Зеолит се већ користи као додатак у храну код животиња, у циљу побољшања производних перформанси и спречавања штетног деловања микотоксина. Дуготрајна суплементација клиноптилолитом има позитивне ефекте на здравље млечних крава међутим утицај зеолита на квалитет и састав колострума крава до сада није изучаван. Поред природних зеолита применом савремених технологија добијена су и нова једињења, и у овој докторској дисертацији коришћен је органски модификован клиноптилолит Minazel Plus® (Patent Co., Србија). Циљ ове дисертације је био да се испита утицај пероралног давања органски модификованог клиноптилолита на квалитет колострума првотелки на основу резултата анализе физичко-хемијских, биохемијских и имунохемијских карактеристика пуног колострума, колостралног и крвног серума.

За оглед је изабрано 36 здравих високо гравидних првотелки холштајн-фризијске расе говеда, 30 дана пре очекиваног термина тељења. Животиње су подељене у две групе, третирану у којој је било 20 јединки и контролну са 16 јединки. Третирана група животиња је почевши од 20 ± 5 дана пре очекиваног термина тељења до два дана после тељења, свакодневно добијала органски модификован клиноптилолит у дози од 150 g дневно, растваран у 1 L воде и даван *per os*, заливањем из стаклене флаше. Контролној групи животиња је свакодневно давана чиста вода у количини од 1 L. Од свих животиња укључених у оглед анализирани су узорци колострума и колостралног серума

из прве четири муже после тељења. Узорци су узимани 2-3 сата након тељења, 12., 24. и 36. сата након тељења. Узимање узорака периферне крви извршено је пункцијом *v. jugularis* непосредно пре почетка огледа, 7±3 дана пред тељење, 1., 2. и 7. дана након тељења.

Код третиране групе првотелки, анализом пуног колострума, установљено је статистички значајно повећање процента масти, суве материје, протеина и концентрације IgG (одређених RID методом „златним стандардом“ за процену квалитета колострума) у односу на контролну групу. Вредност pH је била статистички значајно нижа код третиране у односу на контролну групу животиња. Код третиране групе првотелки, анализом колостралног серума, установљена је статистички значајно виша вредност концентрације укупних протеина и γ глобулина (одређених електрофорезом у гелу агарозе) у односу на контролну групу. Квалитет колострума је процењиван и рефрактометријском анализом, употребом дигиталног Brix рефрактометра. Просечна вредност %Brix-а у колоструму третиране групе првотелки је била статистички значајно виша у односу на средњу вредност %Brix-а колострума контролне групе. Такође показано је да вредности %Brix-а у колоструму високо корелирају са концентрацијом IgG у колоструму и са концентрацијом γ глобулина и укупних протеина у колостралном серуму. Резултатима анализе сензитивности и специфичности Brix рефрактометрије показано је да гранична вредност %Brix-а која дефинише квалитетан први и други колострум (са више од 50 g/L IgG) износи 18%.

Ефекат пероралног давања органски модификовног клиноптилолита на хомеостазу параметара периферне крви првотелки је процењен на основу резултата мерења основних метаболичких параметара периферне крви, анализе концентрације протеина главних електрофоретских фракција крвног серума (α , β , γ глобулини и албумини) и релативне заступљености γ глобулинских фракција. Концентрације укупних протеина, албумина, глукозе, урее, триглицерида, холестерола, бета-хидрокси бутирата, калцијума, магнезијума и фосфора у крвним серумима третиране групе првотелки нису биле статистички значајно различите у односу на контролну групу, што је показало да суплементација органски модификованим клиноптилолитом није имала

нежељене ефекте на метаболизам протеина, енергетски статус, и метаболизам липида и минерала првотелки у перипарталном периоду. Статистички значајне разлике у концентрацијама главних електрофоретских протеинских фракција крвног серума између третиране и контролне групе животиња такође нису забележене. Међутим, релативни садржај фракције брзих, анјонских γ глобулина, који у себи преобладајуће садрже IgG1, је код третираних у односу на контролну групу био повишен 7 ± 3 дана пре телења и смањен 1. дана телења што указује на повећану синтезу и транспорт IgG1 у колострум код третиране групе животиња.

Збирно резултати овог рада показују да третирањем првотелки пред телење препаратом Minazel Plus[®] који садржи органски модификован клиноптилолит постиже се ефекат лучења колострума са високим садржајем имуноглобулина G што утиче на стицање бољег пасивног имунитета код новорођене телад.

Кључне речи: IgG, квалитет колострума, првотелке, органски модификован клиноптилолит

Научна област: Ветеринарска медицина

Ужа научна област: Физиологија

UDK број: 619:591.146:636.2

**The effect of oral administration of organically modified clinoptilolite on
colostrum quality in primiparous dairy cows**

SUMMARY

For the health and survival of newborn calves, it is of utmost importance that an adequate amount of good quality colostrum is taken immediately after birth. In addition to its function as the primary source of nutrients, colostrum has an essential function in providing immune protection to calves in the early stages of life. Ingestion of high quality colostrum during the first hours of life provides calves with sufficient amount of immunoglobulin necessary to establish passive immunity during the first three months of life.

Zeolite is already used as an additive in animal nutrition, in order to improve production performance, and the major effect of zeolite is prevention of mycotoxicosis. Long-term supplementation with the clinoptilolite has positive effects on health in dairy cows, but the effect of zeolite on quality and composition of the colostrum has not been studied so far. In addition to natural zeolites, new compounds were also obtained using modern technologies, and in this doctoral dissertation, organically modified clinoptilolite Minazel Plus[®] (Patent Co., Serbia) was used. The aim of this dissertation was to investigate the effect of oral administration of organically modified clinoptilolite on colostrum quality in primiparous dairy cows on the basis of results of analysis of physico-chemical, biochemical and immunochemical characteristics of the full colostrum, colostrum and blood serum.

The total number of 36 healthy pregnant Holstein heifers was included in this study, starting 30 days before the expected calving date. Animals were divided into two groups: treated heifers (N=20) and control group of heifers (N=16). The treated group of animals has received oral supplementation of organically modified clinoptilolite, in a dose of 150g per day, dissolved in 1L of water and given by a glass bottle, starting from 20±5 days before the expected calving term up to two days after calving. The control group of animals has received pure water in the same amount (1L) and time as treated animals. Samples of colostrum and colostrum serum from the first four milkings were collected and analyzed in all experimental animals included in the study. The colostrum samples were taken 2-3 hours after calving, 12,

24. and 36. hours after calving. Peripheral blood sampling was performed by v. jugularis puncture immediately before the start of the experiment, 7 ± 3 days before calving, and at the days 1, 2. and 7. after calving.

The percentage of fat, dry matter, protein and immunoglobulin G (IgG) concentration in colostrum (determined by the RID method, "gold standard" for assessing the quality of colostrum) was significantly increased in the primiparous dairy cows orally supplemented with organically modified clinoptilolite. The pH value of colostrum was significantly lower in the treated group. Total proteins and γ globulins concentrations in the colostrum serum (determined by electrophoresis in the agarose gel) was significantly higher in the treated group. The quality of the colostrum was also evaluated using a digital Brix refractometer. The average value of %Brix in the colostrum of the treated group was initially significantly higher than the %Brix value of the colostrum in control group. It has also been shown that the %Brix values in the colostrum are highly correlated with the concentration of IgG in the colostrum and with the concentration of γ globulin and total proteins in the colostrum serum. Results of the sensitivity and specificity analysis of the Brix refractometry showed that the %Brix value that defines acceptable quality of the first and second colostrum (colostrum with IgG concentration ≥ 50 g/L) is 18%.

An assessment of the effect of oral administration of organically modified clinoptilolite on the homeostasis of peripheral blood metabolic parameters that was based on the concentrations of total proteins, albumin, glucose, urea, triglycerides, cholesterol, beta-hydroxy butyrate, calcium, magnesium and phosphorus in the blood serum showed that there were no significant differences between treated and control group, indicating that oral supplementation of organically modified clinoptilolite had no adverse effects on protein metabolism, energy status, and metabolism of lipids and minerals initially in the peripartal period. There were also no significant differences between experimental groups regarding major electrophoretic blood serum fractions (α , β , γ globulins and albumin) and the relative content of blood serum γ globulin fractions. However, the relative content of fast anionic γ globulin fraction, containing mostly IgG₁, was significantly increased in the treated group at 7 ± 3 days before calving, and significantly decreased at the day 1. after calving,

indicating increased synthesis and transport of IgG into the colostrum in the treated group.

The overall results of this dissertation show that the oral supplementation of primiparous dairy cows during peripartal period with the organomodified clinoptilolite (Minazel Plus[®], Patent Co., Serbia) has effectively increased secretion of high quality colostrum with increased immunoglobulin G content, which influences the acquisition of better passive immunity in newborn calves.

Key words: IgG, colostrum quality, primiparous dairy cows, organically modified clinoptilolite

Scientific area: Veterinary medicine

Specific scientific field: Physiology

UDK number: 619:591.146:636.2

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	7
2.1. Колострогенеза	7
2.2. Састав колострума	9
2.2.1. Протеини	9
2.2.1.1. Имуноглобулини	10
2.2.2. Нутритивни састојци колострума	17
2.2.3. Хормони, цитокини, фактори раста и леукоцити	18
2.3. Фактори који утичу на састав колострума	19
2.3.1. Индивидуалне варијације	20
2.3.1.1. Раса крава	20
2.3.1.2. Клима	21
2.3.1.3. Број лактације	21
2.3.1.4. Вакцинација	22
2.3.1.5. Дужина периода засушења	22
2.3.1.6. Запремина излученог колострума	22
2.3.1.7. Време сакупљања колострума	23
2.3.1.8. Пуловање колострума	23
2.4. Значај колострума за раст и развој телади	24
2.5. Методе испитивања квалитета колострума	25
2.6. Начини за побољшање квалитета колострума исхраном крава	28
2.7. Зеолит - органски модификован клиноптилолит	28
2.7.1. Прве примене зеолита у живинарској и свињарској производњи	31
2.7.2. Примена зеолита у говедарској производњи	33
3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ ИСТРАЖИВАЊА	37
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА	39
4.1. Материјал	39

4.1.1. Испитиване групе првотелки	39
4.1.2. Препарат органски модификованог клиноптилолита Minazel Plus®	40
4.2. Методе рада	41
4.2.1. Колострум	41
4.2.2. Издвајање колостралног серума	42
4.2.3. Крвни серум	42
4.2.4. Одређивање концентрације одабраних биохемијских параметара крви	43
4.2.5. Одређивање концентрације укупних протеина у колостралном и крвном серуму	43
4.2.6. Агарозна електрофореза протеина (АЕП) колостралног и крвног серума и одређивање концентрације протеина у главним електрофоретским фракцијама	44
4.2.7. Одређивање концентрације IgG у колоструму радијалном имунодифузијом (RID тест)	46
4.2.8. Хемијске анализе колострума	47
4.2.9. Рефрактометријска анализа колострума	48
4.3. Статистичка обрада података	48
5. РЕЗУЛТАТИ	50
5.1. Утицај пероралног давања органски модификовног клиноптилолита на квалитет колострума првотелки	50
5.1.1. Процент суве материје у пуном колоструму	50
5.1.2. Процент масти у пуном колоструму	52
5.1.3. Вредност рН у пуном колоструму	54
5.1.4. Процент воде у пуном колострму	56
5.1.5. Процент суве материје без масти у пуном колоструму	57
5.1.6. Процент протеина у пуном колоструму	59
5.1.7. Процент Вrix-а у пуном колоструму	61
5.1.8. Концентрација укупних протеина у колостралном серуму	63
5.1.9. Концентрација γ глобулина у колостралном серуму	65
5.1.10. Концентрација IgG у пуном колоструму	67

5.1.11. Запремина излученог колострума	69
5.1.12. Маса γ глобулина у колостралном серуму	70
5.1.13. Маса IgG у колоструму	72
5.1.14. Дијагностичке карактеристике Brix рефрактометрије као методе за процену квалитета колострума	75
5.2. Утицај пероралног давања органски модификовног клиноптилолита на хомеостазу параметара периферне крви првотелки	81
5.2.1. Утицај пероралног давања органски модификовног клиноптилолита на основне биохемијске/метаболичке параметре периферне крви испитиваних првотелки	81
5.2.2. Утицај пероралног давања органски модификованог клиноптилолита на концентрацију протеина главних електрофоретских фракција крвног серума првотелки	81
5.2.3. Утицај пероралног давања органски модификованог клиноптилолита на релативну заступљеност γ глобулинских фракција крвног серума првотелки	86
6. ДИСКУСИЈА	89
7. ЗАКЉУЧЦИ	104
8. ЛИТЕРАТУРА	106

1. УВОД

Колострум је секрет млечне жлезде који се излучује првих 36 сати након партуса и представља основни извор нутритивних материја - протеина, масти и угљених хидрата, хормона, фактора раста и минералних материја за новорођено теле. За здравље и преживљавање новорођене телад од есенцијалног значаја је уношење адекватне количине колострума доброг квалитета одмах после рођења. Поред своје функције као основног извора нутритијената, колострум има есенцијалну функцију у обезбеђивању имунске заштите телета у раним фазама живота. У току интраутериног живота, фетус телета се углавном развија у стерилним условима, без антигене стимулације. С обзиром на структуру плаценте код говеда, телад се рађају без имуноглобулина у крви што се означава као физиолошка агамаглобулинемија. Због овога, имунска заштита новорођене телад и телад у најранијем животном добу у потпуности зависи од пасивног трансфера, тј. преноса, матерналних имуноглобулина преко колострума у циркулацију телета.

Колострум се разликује од млека по већој специфичној тежини и различитој квантитативној и квалитативној заступљености већине састојака. Колострум садржи врло високу концентрацију имуноглобулина (40-200 g/L). Највећи део (85-90%) имуноглобулина у колостралном серуму су молекули имуноглобулина G класе. Остали имуноглобулини, класе M и A чине свега 7% и 5% од укупних имуноглобулина у колоструму. Од укупних IgG молекула колострума, 80-90% чине молекули IgG1 подкласе. Концентрација IgG у колоструму је стога примарни фактор од кога зависи пасивни трансфер и употребљава се као главни параметар за процену квалитета колострума.

Према међународним стандардима колострум високог квалитета је онај који садржи више од 50g/L IgG. На концентрацију IgG у колоструму утичу бројни фактори: здравствени статус крава, волумен колострума, време до прве муже, годишње доба, раса, дужина периода засушења, вакцинација. Истраживања су показала да концентрација колостралних IgG показује велику индивидуалну варијацију, због чега се ниво IgG креће у распону од мање од 20 до више од 100

g/L. Ова разлика у концентрацији IgG у колоструму је одговорна за постојање разлика у трансферу пасивног имунитета новорођеном телету, тј. за постојање неуспешног и успешног трансфера пасивног имунитета.

Данас се сматра да краве у првој и каснијим лактацијама дају колострум задовољавајућег квалитета, ако су здраве, вакцинисане, имају потребну дужину периода засушења и оптималан менаџмент транзиционог периода. Концентрација имуноглобулина у колоструму крава варира и у зависности од броја лактација, тако да је она нижа код првотелки у односу на старије краве. Колострум првотелки би требало третирати као колострум крава и користити га у исхрани телаци када задовољава критеријуме квалитета. Старије краве обично имају велики диверзитет антитела у колоструму због нормалног, годинама условљеног, сазревања имунског репертоара који настаје као резултат контаката (првих и поновљених) са много већим бројем различитих антигена. Међутим, у задњих десет година показано је да и првотелке могу да производе квалитетан колострум што је највероватније резултат модерног и новог приступа одгоју млечних крава који укључује поклањање велике пажње исхрани и програму вакцинације.

Варијације у садржају IgG у колоструму код млечних крава указују на потребу за унапређењем контроле квалитета колострума и подешавања режима исхране колострумом у циљу обезбеђивања адекватног имунског статуса новорођене телаци. Стога би контролисање квалитета колострума пре храњења телаци требало да буде уведено у рутинску праксу. До сада је највећи број истраживања која су имала за циљ унапређење квалитета колострума био усмерен на аспекте који се односе на време храњења, количину колострума и методе исхране телаци. Међутим, истраживања нису била довољно усмерена на испитивање квалитета колострума, који се пре свега процењује на основу садржаја IgG у њему. Развијено је више метода за процену концентрације колостралних IgG које се могу користити директно, одмах по узимању колострума, у шталским условима. Рефрактометрија рађена оптичким и дигиталним Вrix рефрактометром се у скорије време наметнула као врло брза, једноставна и не много скупа метода која са довољном тачношћу омогућава раздвајање колострума доброг квалитета (колострум који садржи више од 50

g/L IgG) од колострума лошег квалитета (колострум који садржи мање од 50 g/L IgG). Одређивање концентрације IgG у колоструму биохемијским и имунохемијским методама које се изводе у лабораторијским условима је најпрецизније, али су ове анализе скупе и потребно је да прође и до два дана између узимања узорка и добијања резултата. Радијална имунодифузија (RID) представља “златни стандард” за одређивање концентрације IgG и употребљава се за одређивање концентрације IgG у крвном серуму и плазми као и у колоструму, тј. у телесним течностима у којима је концентрација IgG велика. Међутим, иако ова метода представља „златни стандард“ она не може да се примени у фармским условима због, пре свега, велике цене коштања и великог временског размака између узимања колострума и добијања резултата и због тога је немогуће применити ову методу када брзо треба донети одлуку да ли одређени колострум треба дати телету или не.

Иако су постојали бројни покушаји да се исхраном млечних крава утиче на добијање максималног волумена и квалитета колострума, доказано је изузетно мало позитивних ефеката. Стога у савременом сточарству, упоредо са применом поступака који су већ нашли своју примену у пракси, постоји потреба за проналажењем нових мера и поступака са циљем унапређења здравствене заштите животиња и остваривања оптималних производних резултата. Неколико година уназад врше се и значајна испитивања могућности примене природних зеолита на бази клиноптилолита код различитих врста и категорија домаћих животиња са циљем повећања продуктивности сточарске производње. Употреба зеолита заснива се на његовој изразитој способности адсорпције различитих штетних материја из дигестивног тракта животиња. На тај начин се може уклонити штетан ефекат неких или фаворизовати утицај других чинилаца у исхрани.

Зеолит је минерална руда сложеног састава, која приликом загревања изгледа као да кључа па је по томе и добила назив (од старогрчких речи *zeo*-врити, кључати и *litos*-камен). Зеолити су природни или синтетски хидратисани алумосиликати алкалних и земноалкалних елемената који поседују специфичну тродимензионалну кристалну структуру сачињену од атома силицијума, алуминијума и кисеоника у чијим се порама налазе

молекули воде. Одликују се способношћу реверзибилне измене молекула воде и адсорпције молекула одговарајућег дијаметра. Имају особину молекулског сита и захваљујући способности измене јона могу да врше измену својих конституената (катјона) без промене сопствене структуре.

У нашој земљи постоји неколико налазишта природне руде зеолита чије је интензивно коришћење почело задњих неколико деценија прошлог века. Сматра се да има преко 50 различитих врста природних зеолита и преко 100 врста добијених синтетским путем. Разлике у квалитету зеолитских руда постоје због њиховог различитог хемијског састава, величине отвора канала, степена јонске измене а тиме и могућности адсорпције молекула. Активни састојак руде је минерал клиноптилолит и од самог почетка експлоатације ове руде па до дана данас улаже се велики труд да се произведе препарат са што већим процентуалним садржајем клиноптилолита.

Зеолит се почео користити као додатак концентрату код исхране крава још од 1960. године, у циљу спречавања штетног деловања микотоксина присутних у хранивима која се користе за спремање оброка, а на првом месту кукуруза. Ово важно деловање зеолита у везивању микотоксина и њиховој елиминацији из организма крава у лактацији се широко користи и у данашњим условима. У нашој земљи прва примена зеолита је остварена у живинарској и свињарској производњи. На великим живинарским фармама, зеолит је са великим успехом коришћен као додатак храни ради спречавања штетног деловања микотоксина, производа гљивица, који се размножавају на клипу кукуруза посебно у лошим климатским условима. У производњи свиња у фармским условима када се у објектима налази велики број животиња, главни проблем је обезбедити нормалне амбијенталне услове што је предуслов за добру конверзију хране и постизање задовољавајућег прираста код животиња. Велика производња амонијака који се ослобађа из екскрета животиња је стална опасност за нарушавање микроклиме у објектима и у тим условима зеолит се показао као моћно средство за везивање амонијака. Поред тога, у интензивној производњи свиња, додавање зеолита у храну има за циљ да се присутни микотоксини вежу и безбедно елиминишу из организма преко дигестивног тракта.

Поред природних зеолита савременом технологијом добијена су и нова једињења као што су органски модификован клиноптилолит Minazel Plus® (Patent Co., Србија). Овај органокомплекс поседује нове активне центре на површини минерала који омогућавају ефикасно везивање не само поларних микотоксина (афлатоксини и ергот алкалоиди) већ и мање поларних микотоксина (зеараленон, охратоксин А, фумонизин и Т-2 токсин).

Зеолит се већ дуго користи и као додатак у исхрани фармских животиња, у циљу побољшања производних перформанси. У задњој деценији прошлог века у литератури се појављују и радови наших аутора који указују да комерцијални препарат зеолита који садржи пречишћени клиноптилолит, даван *per os* теладима и прасадима као додатак у колоструму, за последицу има значајно повећање степена ресорпције колостралног IgG у првих шест сати живота. Ово је био податак од велике важности за узгој телади, а показани позитиван ефекат је довео до регистрације препарата Minazel S® (Patent Co., Србија) који је нашао успешну примену у говедарској производњи за узгој младе телади. Дуготрајна истраживања значаја/добробити употребе зеолита код подмладка млечних крава подстакла су нас на даља истраживања ефеката пероралне примене органски модификованог клиноптилолита код првотелки на њихове лактационе перформансе, а посебно на производњу и квалитет колострума, имајући у виду да постоје подаци да примена зеолита има позитиван ефекат на млечност, као и на састав млека.

За сада не постоје подаци о утицају органски модификованог клиноптилолита на квалитет колострума првотелки. С обзиром на директну повезаност концентрације IgG и квалитета колострума, оваква истраживања која дефинишу начине побољшања квалитета колострума су од велике важности због огромног значаја колострума као примарног извора широког спектра имунских и нутритивних компоненти за здравље телади. Ово би било посебно значајно код првотелки чији би високо квалитетан колострум несметано могао да се користи у исхрани телади, а тиме би се омогућило успостављање адекватног трансфера пасивног имунитета, нормалан развој телади, превенција болести и позитиван утицај на будуће добре производне резултате. Квалитетан колострум првотелки био би од великог значаја и са

аспекта додатне количине расположивог колострума доброг квалитета на фармама високо млечних крава.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Колострогенеза

Колострум је секрет млечне жлезде који се излучује првих 36 сати након партуса и представља прву и једину храну коју новорођенче добија током свог раног постнаталног периода. Новорођене јединке многих врста домаћих животиња (теле, јагње, јаре, прасе, ждребе) у потпуности зависе од уношења адекватне количине колострума преко кога се снабдевају нутритијентима, антителима и биолошки активним пептидима. С обзиром на синдезмохоријални тип плаценте код крава, телад се рађају без имуноглобулина у крви (физиолошка агамаглобулинемија) (Arthur и сар., 1996) или су имуноглобулини присутни само у траговима (Weaver и сар., 2000; Chigerwe и сар., 2008). Исхрана колострумом високог квалитета у првим сатима живота обезбеђује теле са довољном количином имуноглобулина за успостављање адекватног пасивног имунитета током првих 30-90 дана живота, све док његов имунски систем не буде довољно развијен/зreo да сам одговори на патогене. Пасивни имунитет стога настаје уношењем имуноглобулина пореклом од мајке у организам младунчета и штити га од свих антигена са којима је мајка долазила у контакт. Неадекватан трансфер пасивног имунитета повећава морбидитет и морталитет код телаци. Трансфер имуноглобулина са мајке на новорођенче назива се пасивни трансфер и од есенцијалног је значаја у заштити новорођенчади од инфективних обољења (Logenz и сар., 2011). Узимање колострума код новорођених јединки има такође велики значај на развој гастроинтестиналног тракта, на ензимску активност и варење, секрецију хормона панкреаса и модификацију абсорптивног капацитета црева (Blum и Hammon, 2000a).

Код домаћих преживара, основна разлика између колострума и млека се огледа у знатно вишој концентрацији имуноглобулина у колоструму. (Barrington и сар., 2001). Синтеза колострума или колострогенеза обухвата пренос имуноглобулина и других биолошких активних молекула из крви мајке у секрет млечне жлезде (Besser и Gay, 1994). У крвном серуму крава се налазе две подкласе имуноглобулина G класе (IgG), IgG1 и IgG2, али у колоструму преодоминантно прелази IgG1 док се ниво IgG2 у крвном серуму релативно

повећава за време лучења колострума. У колоструму концентрација IgG1 је 5 до 10 пута већа од концентрације IgG2. Прелазак IgG из крви у секрет млечне жлезде омогућен је специфичним транспортним механизмом. Епителне ћелије млечне жлезде у својој мембрани имају специфичне рецепторе за које се везују Fc фрагменти IgG1 подкласе (bFcRn) и у комплексу са њима, процесом који се назива трансцитоза, кроз епителне ћелије прелазе у колострум (Larson и сар., 1980; Baumgucker и Bruckmaier, 2014). Током колострогенезе недељно се пренесе до 500g IgG1 (Brandon и сар., 1971; Goff и Horst, 1997). Поред имуноглобулина који потичу из крви, колострум садржи имуноглобулине који настају локалном синтезом у плазма ћелијама ткива млечне жлезде. Сав IgG1, највећи део IgM и око половина укупне количине IgA колострума крава потиче из крви, док се остатак молекула IgA и IgM локално синтетише у млечној жлезди (Larson и сар., 1980).

Колострогенеза је регулисана лактогеним хормонима, прогестероном и естрогеном који су одговорни за прелазак имуноглобулина из крви у секрет млечне жлезде (Barrington и сар., 2001). Крајем гравидитета региструју се временски зависне промене у концентрацији ових хормона: 1) месец дана пре тељења долази до повећане синтезе и повећаног нивоа естрогена; 2) недељу дана пред тељење региструје се повећан ниво кортикостероида, фактора раста и пролактина; 3) један до два дана пред тељење региструје се значајно смањење нивоа прогестерона (Tucker, 1985). Естрогени, нарочито 17- β -естрадиол, су неопходни за диферентовање нових епителних ћелија млечне жлезде на чијим се мембранама налазе специфични рецептори за IgG1 (Schabbacher и Smith, 1975; Croon и сар., 1976). Пад нивоа прогестерона изазива пораст синтезе састојака млека. Кортикостероиди (Winger и сар., 1995) заједно са пролактином (Barrington и сар., 1999) инхибирају процес колострогенезе и индукују обилно лучење млека након порођаја.

Поред ендогене контроле постоји и локална регулација колострогенезе која се одвија у самој млечној жлезди. Локална регулација је одговорна за варијације у садржају имуноглобулина и саставу колострума између појединих четврти вимена (Guidry и сар., 1980; Barrington и сар., 2001).

2.2. Састав колострума

Колострум крава састоји се од мешавине секрета пореклом из млечне жлезде и састојака серума крви, који се акумулирају у млечној жлезди за време периода засушења (Foley и Otterby, 1978) (Слика 2.1). Састојци колострума су имуноглобулини, матернални леукоцити, фактори раста, хормони, цитокини, неспецифични антимикуробилни фактори, ензими, витамини, минерали и хранљиве материје (протеини, масти и угљени хидрати) (Godden, 2008). Колострум се по свом саставу у великој мери разликује од правог млека. Главне разлике се огледају у садржају суве материје, масти, протеина а посебно у нивоу имуноглобулина. Једини састојак који је у колоструму мање заступљен него у млеку је лактоза (Campana и Baumrucker, 1995; Blum и Hammon, 2000a).

2.2.1. Протеини

Протеини колострума крава имају важну улогу у исхрани и успостављању пасивног имунитета код новорођене телад (Guilloteau и сар., 1997). Протеински састав колострума није уједначен и након тељења квантитативно се брзо мења са временом, нарочито у погледу односа укупног садржаја албумина и глобулина наспрам казеина. Првог дана секреције колострум садржи око 75% протеина млечног серума (албумина и глобулина), а 25% казеина. Након 48 часова у колоструму се налази 75% казеина и 25% протеина млечног серума, што указује на почетак секреције правог млека (Campana и Baumrucker 1995; Blum и Hammon 2000b; Gvozdić и сар., 2003).

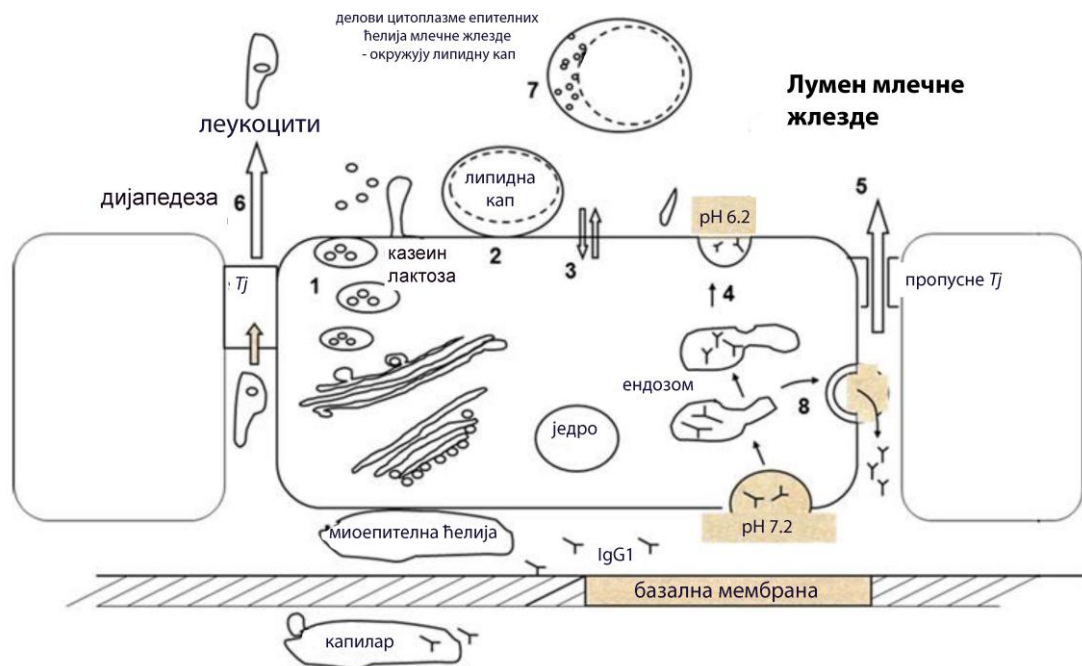
Колострум просечно садржи 14% протеина што је много више од садржаја протеина у млеку који износи 3,1% (Foley и Otterby, 1978; Kračmar и Zeman, 2015). Главни протеини у колоструму крава су имуноглобулини, лактоферин, трансферин, α -лактоглобулини, β -лактоглобулини и албумини (Kehoe и сар., 2007). Поред нутритивне, протеини колострума имају улогу у имунској заштити новорођеног телета (имуноглобулини, лактоферин, лизозим), имају функцију транспорта витамина (фолне киселине, витамина D) или сами делују као физиолошки регулатори (хормони и фактори раста).

2.2.1.1. Имуноглобулини

Колострум крава садржи врло високу концентрацију имуноглобулина (30-200 g/L) (Gapper и сар., 2007). Највећи део (85-90%) имуноглобулина у колоструму су IgG, при чему од укупних IgG молекула колострума 80-90% чине молекули IgG1 подкласе (Larson и сар., 1980). Остали имуноглобулини, IgM и IgA класе чине свега 7% и 5% од укупних имуноглобулина (Korhonen и сар., 2000; Godden, 2008). Концентрација IgG је примарни фактор од кога зависи пасивни трансфер и употребљава се као главни параметар за процену квалитета колострума.

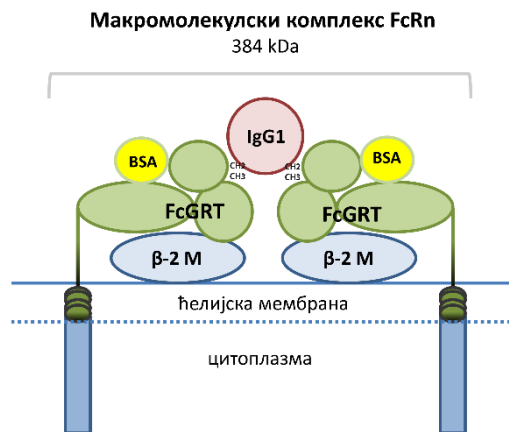
Квантитативно најважнији имуноглобулини колострума су IgG и то они који припадају IgG1 подкласи и потичу из крвног серума (Barrington и сар., 1997). Транспорт ових молекула из серума у млечну жлезду започиње неколико недеља пре тељења и достиже максимум 1-3 дана пред тељење (Brandon и сар., 1971). Селективност транспорта имуноглобулинских изотипова је регулисана механизмом у који су укључени тзв. неонатални рецептори (FcRn) на епителијалним ћелијама ацинуса млечне жлезде (слика 2.2) (Sasaki и сар., 1977; Kacs Kovics и сар., 2000). Ови рецептори везују молекуле IgG1 и IgG2, али се IgG2 рециклирају и враћају у крв, док IgG1 бивају излучени у колострум процесом трансцитозе. FcRn је важан не само за процес трансцитозе IgG у колострум, већ и као катаболички рецептор који штити ове молекуле од деградације. На тај начин, FcRn се укључује у одржавање нивоа имуноглобулина G у циркулацији мајке чиме се објашњава и смисао процеса рециклирања IgG2 подкласе код говеда (Brandon и сар., 1971). Услед овог процеса, концентрација IgG1 у крвном серуму крава се знатно смањује, док се ниво серумских IgG2 који се не преноси у колострум, релативно повећава за време лучење колострума (слика 2.3). Овим видом природног компензаторног механизма ублажава се губитак веће количине једне изотипске категорије имуноглобулина што је од значаја за имунску заштиту мајке.

Смањење концентрације IgA и IgM у крвном серуму крава у току селективног транспорта IgG није запажено, што указује да се ове класе имуноглобулина делом синтетишу локално у млечној жлезди (Brandon и сар., 1971).



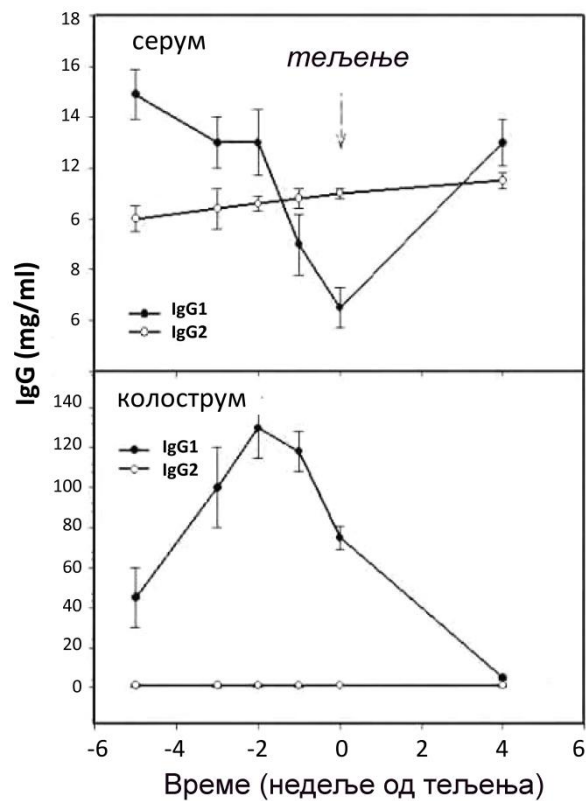
Слика 2.1. Шематски приказ преноса и акумулације молекулских и ћелијских компоненти у колострум и млеко краве.

1-3) механизми преноса протеина, лактозе, масти и воде; 4) трансцитоза: пренос IgG1 и неких хормона (пролактин); 5) „цурење“ уских веза (енглески: tight junctions; Tj), 6) улазак неутрофила, макрофага и лимфоцита дијапедезом; 7) насумично лепљење компоненти епителних ћелија (ензими, рибозоми) за липиде током формирања липидних глобула; 8) рециклирање системских протеина. Преузето из Ваитрucker и Врукмајер (2014).



Слика 2.2. Шематски приказ структура FcRn комплекса у мембрани ендозома ћелија млечне жлезде крва.

FcGRT: транспортер α , субјединице рецептора за Fc фрагмент IgG; β -2-M: β -2-микроглобулин; BSA: говеђи албумин. Преузето из Ваитцрукер и Врукмајер (2014).



Слика 2.3. Промене у концентрацији IgG1 и IgG2 у серуму и млечној жлезди у периоду око тељења

Преузето са <https://vimeo.com/48549575>

Имуноглобулини говечета*

Имуноглобулини су протеини са биолошком функцијом антитела. Они су главни ефекторни молекули хуморалне имуности који реагују са патогеним структурама и посредују у њиховом уклањању из организма. Специфична структура молекула имуноглобулина омогућава да ови молекули имају две функције: функцију препознавања (везивања) антигена и ефекторну функцију (преципитација, аглутинација, неутралисање активности антигена, активирање система комплемента, везивање за мембране одређених ћелија, припрема антигена за фагоцитозу) која за последицу има ефикасно уклањање антигена из организма.

У састав структуре молекула имуноглобулина, улази четвороланчана функционална јединица састављена од два идентична краћа полипептидна ланца од 220 аминокиселина, који су означени као лаки (L) и два идентична дужа полипептидна ланца од 440 аминокиселина, који су означени као тешки (H) ланци. Лаки и тешки ланци, као и тешки ланци међусобно, повезани су ковалентним дисулфидним (S-S) везама и великим бројем нековалентних интеракција (слика 2.4). Међусобним повезивањем тешки ланци формирају на средини молекула тзв. зглобни пептид који је битан за флексибилност молекула. Молекулска маса овакве макромолекулске јединице имуноглобулина износи ~150 kDa. Та јединица се у неким имуноглобулинима понавља два или више пута стварајући полимерне форме имуноглобулина. Тродимензионалну структуру молекула свих имуноглобулина карактерише постојање глобуларних јединица-домена којих у лаким ланцима има по два, а у тешким по четири или пет. Молекул у целини има 12 или 14 глобуларних домена. Сваки домен је одговоран за одређену биолошку активност имуноглобулина. Глобуларни домени представљају структурну основу мултифункционалности сваког појединачног молекула имуноглобулина.

N-терминални домени тешких и лаких ланаца формирају два антиген-везућа места (активна места, паратопи) преко којих молекул реагује са антигеном. Ови домени су означени као варијабилни (V) због променљивости у редоследу аминокиселина у њима којима је одређена специфичност сваког

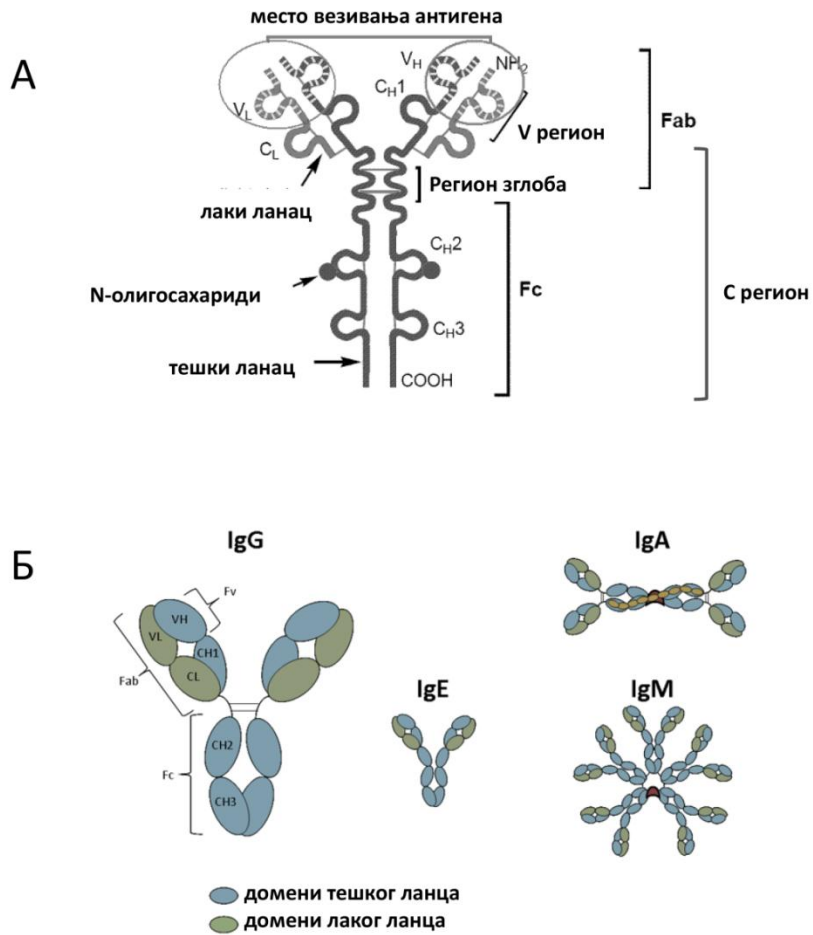
* Део текста који описује структуру имуноглобулина је написан према Nezlin R, 1998.

појединог молекула као антитела. Варијабилни домени лаких ланаца означени су симболом VL а варијабилни домени тешких ланаца означени су симболом VH. Остали домени су означени као константни (C) домени који не одређују специфичност ка антигену и чији редослед аминокиселина није променљив. Лаки ланци имају по један C домен (CL) а тешки по три или четири C домена (CH1, CH2, CH3, CH4) (слика 2.4). Специфичност говеђих IgG представља додатну интраланчану дисулфидну везу у CH1 домену. Преко C домена тешких ланаца имуноглобулини остварују своје ефекторске функције: реаговање са комплементом, везивање за ћелије, транспорт кроз мембрану и др. Нековалентним повезивањем домена у парове, у имуноглобулинским молекулима се формирају три велике глобуларне субструктуре: два идентична, Fab региона (VH/VL, CH1/CL доменски парови) и један Fc регион (CH2/CH2, CH3/CH3, CH4/CH4 доменски парови) које спаја зглобни пептид. Зглобни пептид омогућава да се глобуларне субструктуре просторно оријентишу у зависности, или независно једне од других, што сваком молекулу даје могућност да различите интеракције оствари истовремено.

Говече поседује четири главне класе имуноглобулина (IgG, IgM, IgA, IgE). Лаки ланци већине говеђих имуноглобулина су λ типа. Као и код људи, и код говеда IgG испољавају највећи молекулски полиморфизам. Он се огледа у постојању три IgG подкласе (IgG1, IgG2 и IgG3). Највећа ралика између подкласа IgG молекула огледа се у редоследу амино киселина у региону зглоба. Док IgG1 молекули имају три интраланчане дисулфидне везе, молекули осталих подкласа имају само једну. Различити изотипови имуноглобулина идентификовани код говеда збирно су приказани у табели 2.1.

Полиморфизам се огледа и у постојању најмање два алотипа на тешким ланцима IgG1 (IgG1^a и IgG1^b), IgG2 (IgG2^a и IgG2^b) и IgG3 (IgG3^a и IgG3^b) подкласе, и једног алотипа на лаким ланцима (B1) (Symons и сар., 1989; Kacs Kovics и Butler, 1996; Tizard, 1996; Rabbani и сар., 1997; Saini и сар., 2007). Алотипови IgG2 молекула се међусобно разликују по аминокиселинској секвенци региона зглоба (хомологија је само 71%). Експресија ових алотипова је везана за узраст говеда, па се IgG2^a алотип јавља раније од IgG2^b алотипа

који се обично не открива пре трећег или четвртог месеца старости код телади холштајн-фризијске расе (Corbeil и сар., 1997).



Слика 2.4. Имуноглобулини говеда. А) Структура основне функционалне јединице молекула имуноглобулина; Б) класе имуноглобулина говеда.

преузето са <http://drtedwilliams.net/kb/index.php?pagename=Immunoglobulins>

Табела 2.1. Физичко хемијске особине имуноглобулина говеда (Butler, 1985).

	IgM	IgG1	IgG2^a	IgG3^a	IgE	IgA
Тешки ланци	μ	γ1	γ2	γ3	ε	α
Молекулска маса тешких ланаца (kDa)	80	58	55	58	68	60
Молекулска маса имуноглобулина (kDa)	1030	161-163	150-154			385-430
Алотипови	B5.4 IL-A50	IgG1 ^a , IgG1 ^b , IgG1 ^c	IgG2 ^a , IgG2 ^b	IgG3 ^a , IgG3 ^b		
Електрофоретска покретљивост	β2	β2	γ			β2
Коефицијент седиментације (S)	19,2-19,7	6,5-7,2	6,5-7,2			10,8-11
Угљени хидрати (%)	10-12	2,8-3,1	2,6-3,0			6-10

Подкласе IgG се међусобно разликују по физичко хемијским, имунохемијским и биолошким особинама (табела 2.1). Молекули IgG1 подкласе су електрофоретски бржи од IgG2 молекула (Kickofen и сар., 1968). Полуживот IgG1 два пута краћи (9,6±1,2 дана) од IgG2 (17,8±0,8 дана), а катаболизам IgG2 подкласе директно зависи од њене концентрације у циркулацији (Nansen, 1970). Молекули IgG1 подкласе активишу и хомологи и хетерологи комплемент, док IgG2 активишу само хомологи комплемент. IgG1 прелазе из крви у колострум што није случај са IgG2 подкласом (Symons и сар., 1989; Tizard, 1996). Подкласе IgG1 говечета показују и разлике у потенцијалу да индукују адхеренцу и фагоцитозу од стране неутрофила и моноцита. IgG2 аглутинују партикуларне антигене док IgG1 не (Tizard, 1996).

Иако су IgG1 говечета по основним физичко хемијским параметрима слични IgG човека и других сисара (коефицијенту седиментације 7S, проценат угљених хидрата 2-4% и др.), својство IgG1 подкласе да се преференцијално накупља у колоструму на крају гравидитета је карактеристика IgG1 говечета. Карактеристика говеђих IgG1 је и њихова велика заступљеност на мукозним површинама тј. чињеница да су код говеда они заправо главни имуноглобулини мукозних површина (Maeyer и сар., 2004).

Имуноглоблини М класе налазе се у форми пентамера и као резултат своје величине испољавају ефикасност код аглутинације и опсонизације бактерија и везивању комплемента (Pike, 1967).

Серумски имуноглобулини А класе су преобладајуће у форми мономера. У секретима се јављају као димери или тримери и у саставу своје структуре садрже секреторну компоненту која штити IgA од дејства протеолитичких ензима, што им омогућава деловање у дигестивном тракту. Секреторни IgA реагују са вирусним и бактеријским антигенима и спречавају везивање патогена за ћелије слузнице и блокирају вирусну и бактеријску колонизацију (Williams и Gibbons, 1972). Иако је присутан у мањим количинама, IgA има важну улогу у локалној заштити од цревних обољења спречавајући везивање ентеропатогених бактерија за слузницу дигестивног тракта (Korhonen и сар., 2000).

2.2.2. Нутритивни састојци колострума

Иако се садржају имуноглобулина у колоструму са имунског аспекта заштите новорођених јединки придаје највећи значај у процени квалитета колострума, нутритивни састав колострума као прве хране за новорођену телад је такође подједнако битан и не сме се занемаривати када се говори о квалитету колострума.

Колострум садржи неколико класа липида, слободне масне киселине, фосфолипиде, гликолипиде, стероиде и липопротеине (Molkentin, 2000). Колострум холштајн-фризијске расе крава садржи између 6,7% (Foley и Otterby, 1978) и 9,4% масти (Mechor и сар., 1992) што је знатно више у поређењу са млеком које садржи просечно 3,6% масти (Foley и Otterby, 1978). Новорођена телад се рађају са релативно малим резервама енергије, при чему липиди чине око 3% од укупне телесне масе (Okamoto и сар., 1986). Велики део садржаја ових липида није у стању да допринесе енергетским потребама телета. За правилно успостављање термогенезе и одржавање телесне температуре од великог је значаја добијање довољно енергије коју обезбеђују масти и лактоза из колострума. Поред тога што су веома битан извор енергије, масне киселине средњих ланаца такође могу играти улогу у антимикуробној заштити од бактеријских и вирусних инфекција (Spring и сар., 2001).

Просечна вредност садржаја суве материје у првом излученом колоструму износи између 23,9% (Foley и Otterby, 1978) и 26,6% (Mechor и

сар., 1992) при чему се у односу на млеко (12,9%), ове високе вредности приписују већем садржају имуноглобулина и осталих протеина у колоструму (Davis и Drackley, 1998). Одређени витамини и минерали, укључујући витамин А, витамин Е, каротен, рибофлавин, витамин Б12, фолна киселина, холин и селен, калцијум, магнезијум, цинк, манган, гвожђе, кобалт, нађени су у већим концентрацијама у колоструму говеда у односу на млеко (Foley и Otterby, 1978; Przybylska и сар., 2007).

2.2.3. Хормони, цитокини, фактори раста и леукоцити

У састав колострума улазе и други биолошки важни молекули, као што су хормони протеинске природе: пролактин, инсулин, соматотропни хормон, (Godden, 2008), стероидни хормони, тироксин, различити фактори раста, цитокини и многобројни ензими (Donovan и Odle, 1994).

Биолошки активне компоненте колострума са антимикуробном активношћу као што су лактоферин, лизозим, и компоненте лактопероксидаза система, присутне су у већој концентрацији у односу на млеко (Pakkanen и Aalto, 1997; Shah, 2000; Elfstrand и сар., 2002). Ове антимикуробне супстанце учествују у неспецифичној одбрани организма од инфекције и заједно са компонентама пасивног имунитета штите новорођене јединке. Олигосахариди у колоструму могу пружити заштиту против патогена делујући као конкуритивни инхибитори за њихово везивање на одређена места на епителним површинама црева (Przybylska и сар., 2007).

Колострум садржи велики број фактора раста који су веома значајни за развој гастроинтестиналног тракта новорођенчади, јер имају важну улогу у процесу морфолошке и функционалне диференцијације ентероцита током раног неонаталног периода када се црево адаптира на постепене промене у исхрани (Baumrucker и Blum, 1994). Од фактора раста у колоструму крава заступљени су: инсулину сличан фактор раста-I (енглески: *Insulin like Growth Factor I; IGF-I*), инсулину сличан фактор раста-II (енглески: *Insulin like Growth Factor II; IGF-II*), епидермални фактор раста (енглески: *Epidermal Growth Factor; EGF*), трансформишући фактор раста (енглески: *Transforming Growth Factor; TGF*), фактор некрозе тумора (енглески: *Tumor Necrosis Factor; TNF*),

протеин сличан фактору раста пореклом из тромбоцита (енглески: *Platelet Derived Growth Factor; PDGF*), фактор раста фибробласта говеда (енглески: *bovine Fibroblast Growth Factor; bFGF*). Најзначајнији фактор раста у секрету млечне жлезде крава је IGF-I (Ху, 1996). IGF-I стимулише раст и развој органа за варење код новорођенчади и редукује њихову ензимску активност у првим недељама живота, односно у време када су телад на млечној исхрани. Концентрација IGF-I у колоструму је чак 100-500 пута виша него у млеку (Ху, 1996). Поред утицаја биолошки активних молекула колострума на правилан развој ткива новорођенчади у првим недељама живота, њихово уношење има и дугорочан ефекат на здравље и каснију производно-репродуктивну способност.

Колострум крава садржи више од 1×10^6 ћелија/mL имунски активних леукоцита пореклом од мајке, укључујући макрофаге (40-50%), Т и Б лимфоците (22-25%) и неутрофиле (25-37%) (Le Jan, 1996; Liebler-Tenorio и сар., 2002; Reber и сар., 2005). Колострални леукоцити могу повећати одговор лимфоцита на неспецифичне митогене, повећати способност фагоцитозе и способност убијања бактерија и стимулисати хуморални имуни одговор код телади (Le Jan, 1996).

Новорођенчад која добијају колострум од мајке који садржи леукоците имају способност развијања антиген-презентујућих ћелија много брже од телади која добијају колострум без леукоцита (Reber и сар., 2005), што је од изузетне важности и значаја за развој и стицање имуног одговора на патогене и вакцине (Chase и сар., 2008). Колострални леукоцити су присутни у свежем колоструму, међутим замрзавањем колострума леукоцити се уништавају (Donovan и сар., 2007). Леукоцити се такође уништавају пастеризацијом колострума, а нису присутни ни у производима који се користе за замену колострума (Donovan и сар., 2007; Godden, 2008).

2.3. Фактори који утичу на састав колострума

Колострум садржи широк спектар нутритивних и имунских компоненти неопходних за новорођену телад. Адекватан пасивни трансфер имунитета је уско повезан са квалитетом колострума, превасходно садржајем имуноглобулина, затим количином унетог колострума и успешности

ресорпције преко црева. С обзиром да највећи део имуноглобулина у колоструму чине имуноглобулини G класе (80-90%), одређивање концентрације IgG у колоструму користи се као поуздан показатељ за процену квалитета колострума. Колострум високог квалитета по међународним стандардима је онај који садржи више од 50 g/L IgG (McGuirk и Collins, 2004).

2.3.1. Индивидуалне варијације

Бројна истраживања су показала да код крава постоје велике индивидуалне варијације у концентрацији колостралних IgG. У истраживању Swan и сар., (2007), код крава холштајн-фризијске расе је утврђено да је концентрација IgG у колоструму просечно износила 76 g/L, са варијацијом од 9 до 186 g/L. У истраживањима и других аутора, утврђено је да концентрација IgG у колоструму значајно варира између крава (од 1-235g/L) са тим да је у 29,4-57,8% узорака колострума концентрација IgG била мања од 50g/L (Gulliksen и сар., 2008, Morrill и сар., 2012a). Бројни су фактори који могу утицати на ове варијације, укључујући расу, годишње доба, број лактације, вакцинацију, дужину периода засушења, волумен, односно количину излученог колострума и време до прве muže, пуловање колострума и историја болести крава (Godden, 2008; Gulliksen и сар., 2008, Conneely и сар., 2013).

2.3.1.1. Раса крава

Истраживања су показала да краве холштајн-фризијске расе производе колострум са укупном количином IgG од 5,6% што је мање у односу на *Guernsey* (6,3%) и *Brown Swiss* (6,6%) расу крава, и статистички значајно ниже од *Ayrshire* (8,1%) и *Jersey* (9,0%) расе крава (Muller и Ellinger, 1981). Утврђено је да су просечне концентрације IgG у колоструму биле скоро двоструко веће код товних раса крава (113,4g/L) у односу на млечне расе крава (42,7g/L) (Guy и сар., 1994). Код млечних раса крава долази до већег трансфера IgG1 у колострум него код товних, али је концентрација IgG1 нижа због дилуционог ефекта већег волумена произведеног колострума.

2.3.1.2. Клима

Клима, односно температура и влажност, представља један од фактора који такође може утицати на састав колострума. Поједина истраживања, али не сва, показала су да изложеност крава високим температурама, тј. топлотни стрес, током касног гравидитета за последицу има производњу колострума лошијег квалитета, са нижом концентрацијом колостралног IgG и IgA и нижом просечном вредности укупних протеина, казеина, лактоалбумина, масти и лактозе (Nardone и сар., 1997; Morin и сар., 2001). Ове промене у квалитету се могу приписати негативном утицају топлотног стреса на унос суве материје (рестрикција у исхрани), али и смањеном протоку крви кроз крвне судове млечне жлезде што доводи до смањеног преноса IgG и хранљивих материја из крви у млечну жлезду и до поремећене имунске реактивности плазмоцита млечне жлезде који производе IgA (Nardone и сар., 1997).

2.3.1.3. Број лактације

Подаци из литературе показују да краве у другој и у каснијим лактацијама имају већу концентрацију IgG у колоструму у поређењу са кравама из прве лактације (Devery-Pocius и Larson, 1983; Morin и сар., 2001). Devery-Pocius и Larson, (1983) су показали да укупна количина IgG свој максимум достиже у трећој и четвртој лактацији, када је количина IgG скоро двоструко већа од оне у првој лактацији. Сматра се да је нижа концентрација IgG у колоструму првотелки вероватно последица тога што су оне биле краће изложене антигенима и изложене мањем броју антигена у односу на старије краве и стога производе мању количину антитела која могу бити транспортована у колострум. Међутим, новија истраживања су показала да је просечна концентрација колостралног IgG код крава у првој, другој и трећој лактацији знатно изнад 50 g/L, што се најчешће употребљава као гранична вредност концентрације која раздваја колострум доброг од лошег квалитета (Tyler и сар., 1999; Kehoe и сар., 2011). Првотелке стога могу производити колострум који задовољава критеријуме високог квалитета и не треба га одбацити. Претпоставља се да је ово резултат модерног и новог приступа третману јуница-првотелки који укључује поклањање велике пажње исхрани,

програму вакцинације и смањивању ризика који могу утицати на производњу колострума лошијег квалитета.

2.3.1.4. Вакцинација

Иако студије значаја вакцинације на квалитет колострума нису дале истоветне резултате, постоје истраживања у којима је утврђено да увођење програма вакцинације крава или првотелки у касним фазама гравидитета, 3-6 недеља пре телења доводи до повећања концентрације колостралних антитела и повећања титра антитела код телад вакцинираних мајки за неке уобичајене патогене као што су *Mannheimia haemolytica* (ранији назив: *Pasteurella haemolytica*), *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, rotavirus и coronavirus. (Waltner-Toews и сар., 1985; Jones и сар., 1988; Hodgins и Shewen, 1996).

2.3.1.5. Дужина периода засушења

Резултати истраживачке студије Pritchett и сар., (1991) су показали да дужина периода засушења (просечно 57 ± 11 дана) није била повезана са концентрацијом IgG у колоструму. Rastani и сар., (2005) су показали да се концентрација IgG у колоструму код крава које су имале период засушења од 28 и 56 дана, такође није разликовала. Међутим, краве са исувише кратким периодом засушења, краћим од 21 дан, или без периода засушења, производе колострум који садржи значајно нижу концентрацију IgG (Dixon и сар., 1961; Rastani и сар., 2005). У студији Grusenmeyer и сар., (2006) је забележено да је код крава са краћим периодом засушења, од 40 дана, произведено 2,2 L мање колострума у поређењу код крава које су имале уобичајени, широко примењени 60-дневни период засушења.

2.3.1.6. Запремина излученог колострума

Запремина, односно количина излученог колострума је један од фактора који може бити повезан са концентрацијом IgG. Запремина првог колострума је променљива и има негативну корелацију са концентрацијом IgG у колоструму. (Baumrucker и сар., 2010; Kehoe и сар., 2011; Conneely и сар., 2013). Као један од разлога за овакву негативну корелацију наводи се ефекат дилуције. Након

порођаја, млечна жлезда завршава селективни транспорт IgG у колострум, и налази се у периоду транзиције до производње правог млека. Осмотски активни молекули, као што је лактоза, повлаче за собом воду и доводе до већег преласка воде у колострум (Baumgucker и сар., 2010). Уколико је количина произведеног колострума већа, долази до ефекта дилуције, при чему се не мења укупна маса већ само концентрација IgG (Baumgucker и сар., 2010). О овоме се мора водити рачуна при исхрани телаци првим колострумом, и кад се у колоструму налази нижа концентрација IgG мора се дати већа количина колострума.

Pritchett и сар., (1991) су приметили да краве које производе мање од 8,5 L колострума током прве муже, дају колострум задовољавајућег квалитета односно концентрације IgG веће од 50g/L, за разлику од крава које у првој мужи произведу већу количину колострума. Претпоставља се да је овај налаз резултат дилуционог ефекта.

2.3.1.7. Време сакупљања колострума

Концентрација IgG у колоструму је највиша одмах након тељења (први колострум), и временом се смањује. Одлагање муже крава након тељења и узорковање првог колострума за 6, 10 или 14 сати доводи до смањења концентрације IgG за 17%, 27% и 33% (Moore и сар., 2005). С обзиром на овај ефекат, препоручено је да се први колострум скупља један до два сата након тељења ако је то могуће, или до највише 6 сати након тељења.

2.3.1.8. Пуловање колострума

Пуловање колострума, односно обједињавање колострума пореклом од више мајки се не препоручује, јер спајање већих количина колострума ниског квалитета могу разблажити мање количине високо квалитетног колострума. Осим тога, храњење телаци пулованим колострумом може довести до ризика настанка повећања броја телаци потенцијално изложених патогенима (Godden, 2008).

2.4. Значај колострума за раст и развој телади

Код великих домаћих животиња, плацента спречава преношење имуоглобулина са мајке на фетус *in utero*. Синдезмохоријални тип плаценте код крава се карактерише формирањем синцицијума између ендометријума мајке и трофобласта плаценте, одвајајући крв мајке од крви фетуса и спречавајући трансмисију имуоглобулина *in utero* (Arthur и сар., 1996). Последишно, телад се рађају без имуоглобулина и зависе од пасивног трансфера матерналних имуоглобулина из колострума за формирање пасивног имунитета. Адекватан пасивни трансфер зависи од квалитета и унете количине колострума и ресорпције имуоглобулина (Weaver и сар., 2000). Узимање адекватне количине колострума доброг квалитета у току прва 24 часа после рођења значајно је за здравље и будуће производне резултате телади. Трансфер имунитета се сматра адекватним уколико је концентрација IgG у крвном серуму 10g/L (Lorenz и сар., 2011). Концентрација укупних серумских протеина од 52 g/L код здраве, добро хидриране телади сматра се такође мером адекватног пасивног трансфера имунитета (Weaver и сар., 2000). Неадекватан трансфер пасивног имунитета (енглески: *failure of passive transfer*; FPT) се јавља када је концентрација IgG у крвном серуму телади 24-48 часова после рођења нижа од 10 g/L (Weaver и сар., 2000). Неадекватан пасивни трансфер имунитета повећава морбидитет и морталитет телади, доводи до смањеног прираста, а дугорочно гледано утиче и на смањену продуктивну способност. Многи фактори могу допринети неадекватном пасивном трансферу имунитета, а посебно они који се односе на организацију исхране колострумом (квалитет, време, количина, начин давања, хигијена колострума).

Колострални имуоглобулини се неизмењени ресорбују у дигестивном тракту новорођених младунаца и та ресорбција је највећег интензитета у првих шест часова после рођења. Временом ентероцити, који по правилу имају кратак век живота и брзо се замењују новим ћелијама, постепено губе способност пиноцитозе интактних имуоглобулина. Популација ентероцита која се појављује после 38 сати након рођења, у потпуности губи способност пиноцитозе колостралних имуоглобулина и после тог времена имуоглобулини се варе у дигестивном тракту као и остали протеини хране. Из

тог разлога, телад би требало да добију колострум 2 до 4 сата после рођења и да унесу 100 до 150g IgG како би била осигурана довољна количина IgG. Због овога се препоручује да се новорођеним теладима, први колострум који садржи адекватну концентрацију (најмање 50 g/L IgG) даје у количини од 2 L до 3 L. Уколико концентрација IgG у колоструму није позната, препорука је да телад у току 24 сата добију колострум у количини 10 до 12% од телесне масе (Godden, 2008). Касније давање колострума, изостанак давања или давање колострума лошег квалитета представља примарни узрок настанка FPT код теледи.

2.5. Методе испитивања квалитета колострума

Одређивање концентрације IgG у колоструму је веома важно за процену квалитета колострума у циљу обезбеђивања адекватног имунског статуса код новорођене теледи. Поред важних нутритивних и биолошких активних компоненти које колострум садржи, однос концентрације имуноглобулина и здравља новорођених теледи је велики број пута потврђен, а с обзиром да IgG чине 85% укупних имуноглобулина колострума, концентрација IgG у колоструму сматра се главним показатељем квалитета колострума. Потреба за контролом/праћењем квалитета колострума и превенирањем неуспешног пасивног трансфера имунитета код новорођене теледи, довела је до развоја већег броја метода-поступака за квантитативно или семиквантитативно одређивање концентрације IgG у колоструму и крвном серуму теледи. Као веома поуздане методе за анализу IgG у колоструму сматрају се имунохемијске технике које се изводе у лабораторијским условима (имуно-нефелометрија, радијална имунодифузија (RID), турбидиметријски имуноесеј (енглески: *turbidimetric immunoassay; TIA*), ензимски имуносорбентни тест (енглески: *enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA*) (Garper и сар., 2007; Quigley и сар., 2013). Златни стандард за одређивање тј. квантификацију IgG у колоструму код говеда, као и у крвном и колостралном серуму, представља RID метода (Chigerwe и сар., 2014). Ова метода је изузетно прецизна и поуздана, али с обзиром на релативно високу цену анализе, релативно дуго време до добијања резултата (од 18 до 72 сата) и потребну опрему за читавање резултата (компјутери, скенери, дензитометри, софтвери) није погодна за рутинску

контролу квалитета колострума на фармама (Fleenor и Stott, 1981; Lee и сар., 2008). Алтернативно имунохемијским тестовима, електрофоретске технике (гел електрофореза, капиларна електрофореза) и хроматографске технике високих перформанси се користе за одређивање концентрације протеина у колостралном серуму говеда (Gapper и сар., 2007). Од наведених техника, електрофореза у гелу агарозе, која омогућава идентификацију и квантификацију протеинских фракција у различитим телесним течностима, се најчешће користи у дијагностици у хуманој и ветеринарској медицини (Серџић и сар., 2010; Тóthová и сар., 2013; Ковачић и сар., 2017). Електрофоретско одређивање концентрације IgG (γ глобулина) је брже и јефтиније од RID методе, а једнако поуздано, али и оно захтева посебну опрему и техничко знање што ову методу, исто као и RID, чини неподесном за рутинску контролу квалитета колострума на фармама.

Ипак као главни недостатак наведених лабораторијских метода који их чини неефикасним у рутинској провери квалитета колострума не представља чињеница да су ове методе скупе и технички захтевне већ то што је за добијање резултата потребно и до 72 сата, што значи знатно после „затварања“ црева за ресорпцију интакних макромолекула као што су имуноглобулини. Због овога се за процену квалитета колострума у фармским условима користе физичке-семиквантитативне технике, које укључују употребу колострометра и рефрактометра којима се резултати добијају у периоду од пар минута (Bielmann и сар., 2010).

Колострометар је хидрометар којим се квалитет колострума процењује на основу специфичне тежине, а заснован је на принципу да постоји позитивна линеарна зависност између специфичне тежине и концентрације IgG (Fleenor и Stott, 1980). Иако колострометрија пружа проивођачима да брзо одреде да ли је колострум доброг или лошег квалитета, ова метода ипак није довољно поуздана. Наиме, често се могу очитати нетачни резултати због осетљивости инструмента на температуру колострума, и чињенице да специфична тежина колострума може да варира зависно од расе крава и сезону године у време тељења (Morin и сар., 2001).

Много реалнија слика о квалитету колострума се добија рефрактометријском анализом тј. употребом рефрактометра (Weaver и сар., 2000). Рефрактометрија је метода којом се одређује индекс преламања светлости као једне од основних особина супстанције. Рефрактометри, дигитални или оптички, користе се за процену концентрације укупних протеина у колоструму и крвном серуму телади (Calloway и сар., 2002; Moore и сар., 2009; Biemann и сар., 2010; MacFarlane и сар., 2015; Morrill и сар., 2015; Hernandez и сар., 2016). Рефрактометрија служи као аналитичка техника за одређивање концентрације сахарозе у течностима као што су воћни сирупи, меласа или вино, или у течностима које не садрже сахарозу за одређивање концентрације укупних чврстих материја (Quigley и сар., 2013). Њена употреба у процени квалитета колострума заснована је на чињеници да протеини представљају знатан проценат укупних чврстих материја у колоструму са великим уделом имуноглобулина као најзаступљенијом протеинском фракцијом и да добијене вредности рефракције у великој мери корелирају са концентрацијом IgG (Morrill и сар., 2012б; Quigley и сар., 2013). Brix рефрактометар користи се за одређивање концентрације имуноглобулина у колоструму код оваца, коња и говеда (Quigley и сар., 2013). Рефрактометрија која користи Brix рефрактометар има предности у односу на друге методе за процену концентрације колостралног IgG. Употреба Brix рефрактометра пружа једноставан, брз и јефтин начин којим произвођачи на лицу места, на фарми, могу пратити програм исхране колострумом, оценити квалитет колострума и одредити ниво укупних серумских протеина код телади као меру процене адекватног пасивног трансфера имунитета. За разлику од колострометрије, метода није осетљива на температуру колострума, сезону године у време партуса и друге факторе (Moore и сар., 2009). Мерењем укупних серумских протеина може се одредити проценат телади са FPT, што даје податак о успешности програма организације исхране колострумом. Пошто вредности рефракције крвног серума и пуне крви, измерене Brix рефрактометром (изражене као %Brix) високо корелирају ($R^2 = 0.95$), тест се може изводити и на фармама на којима по правилу не постоји центрифуга за издвајање крвног серума (Wallace и сар., 2006).

2.6. Начини за побољшање квалитета колострума исхраном крава

Постоје бројни начини да се исхраном млечних крава утиче на добијање максималног волумена и квалитета колострума. Да би неки узорак био класификован као колострум задовољавајућег квалитета, међународна препорука је да има концентрацију IgG од најмање 50 g/L (Godden, 2008). Показано је да исхрана крава у периоду засушења која се спроводи према препорукама *National Research Council* (NRC, 2001), а која је јединствена кроз цео тај период, у односу на стратегију исхране која подразумева два нивоа оброка (један на почетку засушења и други три недеље пре партуса), а која превазилази препоруке NRC-а, нема ефекта на волумен, концентрацију IgG или укупну масу IgG у првом колоструму (Richards и сар., 2009). Santos и сар., (2001) су испитивали утицај нивоа протеина у исхрани крава три недеље пре телења на квалитет колострума. Првотелке и краве су биле подељене на оне које су добијале 12,7% или 14,7% сировог протеина (са 36% и 40% протеина који нису разградиви у румену) храном три недеље пре телења. Исхрана са високим садржајем протеина није имала ефекта на концентрацију IgG и волумен колострума, ни код првотелки ни код крава. Суплементација витамином Е и селеном код крава током касног гравидитета може довести до повећаног волумена, односно количине излученог колострума али такође није имала ефекта на концентрацију IgG (Lacetera и сар., 1996). Све ове студије и њихови резултати говоре у прилог томе да овај проблем изазива велику пажњу научне и стручне јавности, да се на његовом решавању интензивно ради, и да се стално траже нова, иновативна решења.

2.7. Зеолит - органски модификован клиноптилолит

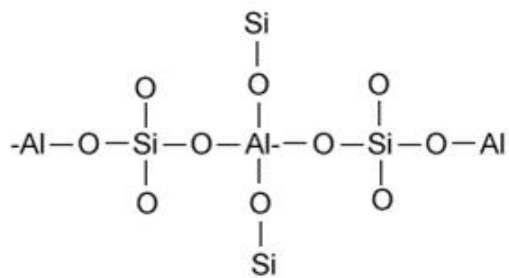
У нашој земљи постоји неколико налазишта природне руде зеолита чије интензивно коришћење је почело у задњих неколико деценија прошлог века. Активни састојак руде је клиноптилолит, и од самог почетка експлоатације ове руде па до данас улаже се велики труд да се произведе препарат са што већим процентуалним садржајем клиноптилолита.

Зеолити су природни или синтетски хидратисани алумосиликати алкалних и земноалкалних елемената који поседују специфичну

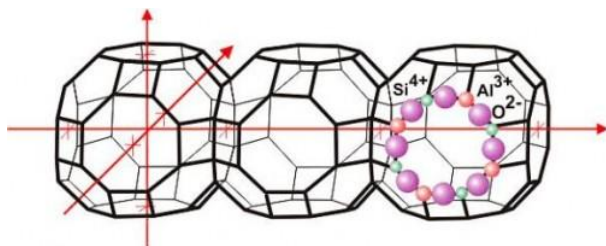
тродимензионалну кристалну структуру. Основну структурну јединицу зеолита представља тетраедар у чијем се центру налази атом силицијума или алуминијум а два суседна тетраедра повезана су преко координатне ковалентне везе атомом кисеоника. Између ових структурних јединица-тетраедара, налази се велики број међусобно повезаних канала испуњених водом чија запремина може бити и до 50% од укупне запремине минерала. У основној структурној јединици зеолита катјон силицијума (Si^{4+}) може да се замени алуминијумом (Al^{3+}) при чему се услед насталог вишка негативног наелектрисања, канали попуњавају једновалентним или двовалентним катјонима као што су Na^+ , K^+ , Ca^{2+} и Ba^{2+} (слика 2.5). Главна карактеристика зеолита је велика моћ јонске измене последично због лаке замене ових катјона другим катјонима. Присуство јона у мрежастој структури зеолита, где нити мреже представљају канале, омогућава примање и отпуштање воде уз истовремену измену катјона, при чему се основна структура битно не мења.

У свету постоје многобројна налазишта руде зеолита. Сматра се да има преко 50 различитих врста природних зеолита и преко 100 врста добијених синтетским путем. И природни и синтетички зеолити су порозни материјали, који се карактеришу способношћу адсорбције молекула одговарајућег пречника (адсорпционо својство или делују као молекуларна сита) и размене својих конститутивних катјона без већих промена њихових структура (својство јонске размене) (Mumpton и Fishman, 1977; Filippidis и сар., 1996). Због ових особина зеолит има широку примену у индустрији и пољопривреди, а посебно у исхрани животиња која је уведена од средине седме деценије XX века (Mumpton, 1999).

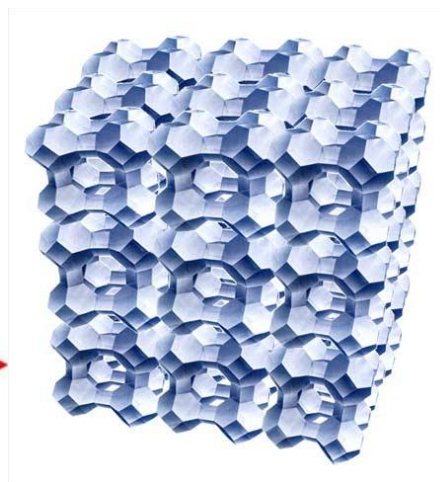
A)



Б)



В)



Слика 2.5. Клиноптилолит: А) хемијска структура; Б) и В) тродимензионална структура

Преузето са: <http://www.akvarij.net/index.php/slatkovodna-akvaristika-othermenu-43/kemija/780-easy-life-ffm-ili-fluid-filter-medium>

У последњих неколико година у нашој земљи је произведено неколико препарата са активном компонентом на бази природног зеолита-клиноптилолита: Minazel[®], Minazel S[®] и Minazel Plus[®] (Patent Co., Србија). У овој докторској дисертацији коришћен је Minazel Plus[®] (<http://www.patent-co.com/minazel3.html>). Minazel Plus[®] је препарат органски модификованог природног клиноптилолита који се састоји од минералне и органске компоненте од којих, у дефинисаном технолошком поступку, као резултат јонске размене између неорганских катјона на површини минерала и

дуголанчаних органских катјона који се додају током процеса производње, настаје органокомплекс. Минералну компоненту овог препарата површински модификованог зеолита чине клиноптилолит (минимално 85%) уз мали удео алуминосиликата (максимум 5%), кварца (максимум 5%) и других минерала глине (од 5-10%). Хемијски је стабилан у дигестивном тракту животиња (у опсегу рН вредности од 2 до 9) и није ресорптиван. Адсорпцијом дуголанчаних органских катјона драстично су промењене физичко хемијске особине спољне површине минерала које се огледају у стварању двоструког слоја органског лиганда на коме се адсорбују неполарни органски молекули. Органокомплекс, као граничну фазу има хидрофобну површину, што га чини компатибилним са неполарним органским молекулима микотоксина (зеараленон, охратоксини, Т-2 токсин и други). Поступком модификације на површини се формирају нови активни центри који чине да Minazel Plus® ефикасно адсорбује микотоксине при чему је адсорпција витамина, аминокиселина и микроелемената занемарљива. Minazel Plus® адсорбује 94% присутног зеараленона, 96% охратоксина А, 84% Т-2 токсина и више од 90% микотоксина из групе ергот алкалоида. Од присутног афлатоксина Б1, на органски модификованом клиноптилолиту Minazel Plus® адсорбује се 99%. Битно је нагласити да је брзина реакције адсорпције микотоксина на минералним адсорбентима довољна да их чини конкурентим у односу на брзину ресорпције микотоксина у организму.

2.7.1. Прве примене зеолита у живинарској и свињарској производњи

Препарати зеолита, са квантитативно и квалитативно најважнијим састојком клиноптилолитом, нашли су велику примену у многим гранама пољопривредне производње. Са доста успеха неки од ових препарата, захваљујући својим лековитим својствима, нашли су примену како у хуманој тако и у ветеринарској медицини. Прва истраживања базирана на примени клиноптилолита у сточарству везују се за живинарство где је прво испитиван утицај клиноптилолита на прираст, конверзију хране, здравствено стање и проценат угинућа у огледу са бројлерима (Willis и сар., 1982), при чему су добијени резултати показали да је дошло до повећања телесне масе и степена искоришћавања хране, а проценат угинућа бројлера је био смањен. Примена

зеолита као коректора амбијенталних услова у објектима за тов бројлера дала је задовољавајуће резултате, који се огледају у побољшању амбијенталних услова и постизању бољих производних резултата (Petrović, 1991).

Последњих година, висок степен инциденције контаминације житарица и хране за животиње са микотоксинима су пријављени широм света (Placinta и сар., 1999). Један од најновијих приступа на ову глобалну забринутост је била употреба нутритивно инертних адсорбената у исхрани која везује микотоксине, чиме се смањује интестинална апсорпција и додатно, избегава пренос токсичних једињења на животињске производе. У ове сврхе препарати зеолита су успешно коришћени у живинарској, свињарској и говедарској производњи. Резултати огледа Kubena и сар., (1990) су показали да присуство додатих токсина у храну, афлатоксина и Т-2 токсина, доводи до смањења телесне масе пилића и повећања масе паренхиматозних органа. Међутим, код пилића храњених истом храном, али уз додатих 5% зеолита, били су значајно мање изражени негативни ефекти афлатоксина, док на другој страни, зеолит није ублажио токсичне ефекте Т-2 токсина. Неколико година касније Kubena и сар., (1993а и 1993б) су у поновљеним огледима на пилићима бројлерима, храњеним крмном смешом са афлатоксином и другим токсичним једињењима, утврдили да додавање зеолита у загађен концентрат у концентрацији од 5%, може и до 90% да смањи токсичне ефекте присутних токсина, а на првом месту афлатоксина. Ово важно деловање зеолита у везивању микотоксина у храни и њиховој елиминацији из организма животиња се нашироко користи и у данашњим условима живинарске, свињарске и говедарске производње.

У производњи свиња у фармским условима када се у објектима налази велики број животиња, велика пажња се посвећује у стварању адекватних амбијенталних услова што је предуслов за добру конверзију хране и постизање задовољавајућег прираста код животиња. Велика производња амонијака који се ослобађа из екскрета животиња је стална опасност за нарушавање микроклиме у објектима, а у таквим условима зеолит се показао као моћно средство за везивање амонијака (Saoulidis и сар., 2001). И у интензивној производњи свиња, додавање зеолита у храну има за циљ да се присутни микотоксини вежу и безбедно елиминишу из организма преко дигестивног тракта. Значајан број

радова из ове области су објавили наши аутори, који су утврдили да је зеолит незаменљив у интензивној свињарској производњи ради постизања доброг здравља, повећања броја рођене и одлучене прасади у леглу, добре конверзије хране и прираста код свиња у различитим фазама узраста (Stankov и сар., 1990; Stankov и сар., 1992; Rajić и сар., 1994).

У задњој деценији прошлог века, а и касније, у литератури се појављује неколико радова наших аутора који су у огледима на новорођеним теладима и прасадима испитивали утицај минералног адсорбента-клиноптилолита, на степен ресорпције колостралних имуноглобулина. Резултати ових истраживања су показали да присуство минералног адсорбента-клиноптилолита (Minazel S[®]) у колоструму који је служио за напајање прасади али и телад, доводи до значајног повећања нивоа IgG у крвном серуму огледне групе у поређењу са контролном групом животиња (Stojić и сар., 1995, 1998).

2.7.2. Примена зеолита у говедарској производњи

Једна од најизазовнијих подручја истраживања код преживара јесу приступи како оптимизирати руминалну ферментацију и функцију, која утиче на све производне процесе преживара, повећањем микробијалне активности у румену и већом производњом бактеријских протеина, које краве могу ефикасно да искористе и тиме повећају своје производне перформансе.

У преджелуцима говеда се налази огроман број микроорганизама у саставу микрофлоре (бактерије и гљивице) и микрофауне (протозое) који ту живе и размножавају се, при чему и сам домаћин од тога има велику корист. Једна од многобројних активности ових микроорганизама је и синтеза *де ново* аминокиселина и протеина, од прекурзора, који воде порекло од протеина хране и непротеинског азота. Један од основних крајњих производа разлагања протеина хране је амонијак. Извесна количина амонијака се ресорбује директно у крв кроз зид бурага, а потом доспева у јетру где се користи за синтезу аминокиселина или се уграђује у уреју. Овако настала уреја у јетри, доспева поново путем плувачке или преко крви у бураг, и служи микороорганизмима као извор непротеинског азота, док се део излучује мокраћом. Азот из амонијака, који се ослобађа дезаминацијом аминокиселина под дејством

ензима пореклом од микроорганизама се користи за синтезу протеина. Да би се овај процес синтезе протеина у бурагу одвијао у задовољавајућој мери, потребно је да се амонијак из наведених извора ослобађа постепено. Утврђена способност јонске размене природних зеолита и способности везивања микотоксина, навело је неке ауторе да испитају ефекте присуства зеолита у храни на ниво биохемијских процеса у бурагу, као и утицај на нека производна својства код говеда.

Код високо квалитетне исхране преживара богате енергијом, већина протеина се брзо деградира и ослобађа се између 56 и 65% концентрације азота током ферментације у бурагу. Међутим, неефикасно рециклирање азота енергетски кошта животињу, с обзиром да долази до великих губитака азота од кога се 25-35% у облику амонијака излучује урином (Min и сар., 2000). Ames (1967) је први изучавао селективност природног зеолита-клиноптилолита за амонијумове јоне. White и Ohlrogge (1974) су утврдили да зеолити могу да везују до 15% амонијумових јона, а затим их лагано отпуштају у садржај бурага и на основу тога су закључили да клиноптилолит може утицати на расположивост азота и последично на метаболизам протеина. Pond (1982) је такође утврдио да зеолит додат у храну испољава велику способност везивања амонијака у преджелуцима говеда, чиме спречава његово накупљање до токсичног нивоа у самом садржају, што се често догађа код исхране говеда храном са високим садржајем протеина. Слична је ситуација и код додавања непотребно великих количина уреје у храну као извора непротеинског азота (Nemken и сар., 1984; Bosi и сар., 2002).

Коришћење уреје или других извора непротеинског азота код млечних крава, као и исхрана која садржи висок проценат растворљивог протеина, могла би изазвати повећање вредности рН и концентрације амонијака у бурагу, и последично повећање концентрације амонијака у крвном серуму што може довести до појаве ризика од токсичности. Зеолит смањује ризик од токсичности спречавајући повећање рН у бурагу и повећање нивоа амонијака у крвном серуму (Bergero и сар., 1997). Истраживање Mumpton и Fishman (1977) је показало да додаток 1% зеолита у храну код крава резултира смањењем рН у бурагу, вероватно због мањег садржаја амонијака у бурагу и повећане

производње испарљивих нижих масних киселина. До истих резултата дошли су и Galindo и сар., (1986). Hemken и сар., (1984) су показали да суплементацијом млечних крава са 6% клиноптилолита као додатак у храни која садржи велику количину уреје, долази до значајног смањења концентрације амонијака у бурагу. Nestorov (1984) је доказао да истовремена примена клиноптилолита и уреје у исхрани код оваца, штити флору бурага од токсичних ефеката амонијака доводећи до инхибиције смањења популације микроорганизама. Везивањем амонијака минерални адсорбер поприма својство резервоара амонијум јона, које по потреби отпушта лагано и постепено, што је од велике користи за неометано одвијање процеса микробијалне синтезе протеина у преджелуцима. Касније, као што је познато, ови структурни протеини бактерија, гљивица и инфузорија биће сварени у следећим одељцима дигестивног тракта, и ослобођени крајњи продукти варења а то су аминокиселине, ће се ресорбовати и путем крви упутити на даље искоришћавање. Повољан утицај природних зеолита на процес микробијалне синтезе протеина у преджелуцима код крава утврдили су и други истраживачи (Hemken и сар., 1984; Galindo и сар., 1986). Galindo и сар., (1986) су проучавали утицај суплементације зеолитом на популацију микроорганизама у бурагу и утврдили су да је дошло до значајног повећања целулолитичке популације бактерија, а смањења амилолитичке и протеолитичке популације. Повећање целулолитичке популације бактерија пронашли су и Nikkhañ и сар., (2007).

Особине зеолита да може бити резервоар амонијака/амонијум јона омогућава додатну суплементацију азотом у исхрани животиња штитећи животињу од токсичне производње амонијака у бурагу. Резултати истраживања указују на то да и природни и синтетички зеолити могу имати одређени утицај на енергетски метаболизам код крава и смањену инциденцу метаболичких поремећаја. Неки истраживачи су утврдили да клиноптилолит може да има утицај на енергетски метаболизам јер је код крава које су у храну добијале клиноптилолит дошло до промена у особинама ферментације у бурагу у смислу промене моларног односа испарљивих масних киселина. Овај ефекат може бити значајан са аспекта утицаја енергетског метаболизма на здравље и продуктивност млечних крава. Зеолит може да се употреби и као егзогени

пуфер у стабилизацији рН у бурагу. McCollum и Galyeon (1983) су запазили да зеолит повећава удео пропионата у бурагу, док су други забележили промену руминалног рН и пораст концентрације ацетата (Karatzia и сар., 2011).

Дуготрајна истраживања значаја/добробити употребе зеолита код подмладка млечних крава подстакла су на даља истраживања ефеката органски модификованог клиноптилолита додатог у храну код крава-јуница на њихове лактационе перформансе, а посебно на производњу и квалитет колострума, имајући у виду да постоје подаци да примена зеолита има позитиван ефекат на млечност, као и на састав млека и то пре свега на протеине млека (Dschaak и сар., 2010). Hornig и сар., (1999) су код крава са додатком 2% зеолита у храну током 13 недеља, приметили значајно повећање масти, протеина и лактозе док су Lopez и сар., (1988) забележили само повећање млечне масти. Насупрот овим резултатима Vosi и сар., (2002) нису утврдили разлике у саставу млека код крава суплементираних зеолитом у односу на несуплементиране краве. Сами аутори као могућ разлог за непостојање ефеката зеолита наводе употребу мање количине зеолита. Истраживања базирана на утицају зеолита додатог у храну (у количини од 2%) на млечност код крава су дала контрадикторне резултате. Lopez и сар., (1992) су утврдили повећање млечности, док су Johnson и сар., (1988) коришћењем синтетског зеолита (А) у току 28 дана добили супротан ефекат. Међутим, у експериментима са дуготрајном суплементацијом клиноптилолитом (у концентрацији од 2,5%) код млечних крава показано је значајно повећање у укупној производњи млека, а аутори сматрају да је овај ефекат можда последица повећане поструминалне дигестије скроба (Lopez и сар., 1992; Dann и сар., 1999). Други аутори су такође показали да суплементација зеолитом (у концентрацији од 3%) утиче на повећање млечности и на смањење броја соматских ћелија у млеку (Alic, 2014). Ефекат дуготрајне суплементације клиноптилолитом код млечних крава имао је позитивне ефекте и на метаболизам и на здравље млечних крава које се огледало кроз смањену инциденцу метаболичких болести (Katsoulos и сар., 2005).

3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ ИСТРАЖИВАЊА

Ова докторска дисертација је имала за циљ да се испита утицај пероралног давања органски модификованог клиноптилолита на квалитет колострума код првотелки и да се на основу резултата анализе главних биохемијских параметара периферне крви испита утицај примењеног третмана на укупно здравље првотелки.

Ради постизања задатог циља, постављани су следећи истраживачки задаци:

1. Одредити хемијски састав пуног колострума (процент суве материје, масти, протеина и вредност рН) у узорцима узетим 2-3 сата након тељења, 12., 24. и 36. сата након тељења, означени редом као 1., 2., 3. и 4. колострум, код контролне и групе третиране органски модификованим клиноптилолитом.
2. Одредити концентрацију IgG у узорцима 1., 2., 3. и 4. колострума код контролне и групе третиране органски модификованим клиноптилолитом методом радијалне имунодифузије.
3. Одредити вредност процента Brix-а у узорцима 1., 2., 3. и 4. колострума код контролне и групе третиране органски модификованим клиноптилолитом.
4. У узорцима колостралног серума 1., 2., 3. и 4. колострума одредити концентрацију укупних протеина и на основу резултата раздвајања протеина у гелу агарозе одредити концентрацију фракције γ глобулина код контролне и групе третиране органски модификованим клиноптилолитом.
5. Валидирати Brix рефрактометрију као методу за процену квалитета колострума корелацијом вредности Brix-а (%) и концентрације укупних протеина и γ глобулина у колостралном серуму и концентрације колостралних IgG одређених RID методом.
6. У узорцима периферне крви контролне и групе третиране органски модификованим клиноптилолитом узетим 20 ± 5 дана пред тељење, 7 ± 3 дана пред тељење и 2. дана након тељења одредити концентрације

следећих биохемијских/метаболичких параметара: укупни протеини, албумини, глукоза, уреа, триглицериди, холестерол, бета-хидрокси бутират, калцијум, магнезијум и фосфор.

7. У узорцима серума периферне крви контролне и групе третиране органски модификованим клиноптилолитом узетим 20 ± 5 дана пред тељење, 7 ± 3 дана пред тељење и 1., 2. и 7. дана након тељења одредити концентрације главних електрофоретских фракција протеина и релативну заступљеност γ глобулинских фракција.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

4.1. Материјал

4.1.1. Испитиване групе првотелки

Испитивања су вршена на 36 високо гравидних првотелки холштајн-фризијске расе говеда са комерцијалне фарме „Падинска скела“ власништво Пољопривредне Корпорације Београд (ПКБ, Србија). Подаци из евиденције ветеринарске здравствене контроле на фарми за све животиње укључене у оглед су показали да ниједна није оболевала пре гравидитета и да за време гравидитета нису показивале клиничке знаке болести. Првотелке су одабране 30 дана пре очекиваног термина тељења и смештене су у издвојеном објекту у којем су држане под истим хигијенско-дијететским условима. Очекивани термин тељења одређен је на основу датума осемењавања. Одабране првотелке подељене су у две групе: 1) третирану у којој је било 20 јединки и 2) контролну са 16 јединки. Првотелке из обе групе су биле уједначене по оцени телесне кондиције која је одређена према систему *Elanco Animal Health Buletin Al 8478 (National Research Council, NRC, 2001)* и на скали од 1 до 5 износила је 3,50 антепартално.

Обе групе првотелки добијале су комплетан мешани оброк (енглески: *Total Mixed Ration*; TMR), два пута дневно уз одговарајући додатак концентроване хране из руке, при чему су састав и количина obroка били у складу са потребама високо гравидних првотелки. Састав и количина хранива у obroку приказани су у табели 4.1.1. Третирана група животиња, почевши од 20 ± 5 дана пре очекиваног термина тељења до два дана после тељења, свакодневно је добијала органски модификован клиноптилолит (Minazel Plus[®], Patent Co., Србија). Органски модификован клиноптилолит, у дози од 150 g дневно, растваран је у 1 L воде и даван *per os*, заливањем из стаклене флаше. Овако припремљен органски модификовани клиноптилолит даван је увек у истом периоду дана, 2 сата након јутарњег obroка. Контролној групи

животиња је свакодневно давана чиста вода у количини од 1 L, у истом периоду и на исти начин као и код третиране групе.

Етички комитет Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду у складу са одредбама Закона о добробити животиња Републике Србије (Службени гласник Републике Србије 41/09) одобрио је употребу животиња и реализацију истраживања.

Табела 4.1.1. Врста и количина хранива у оброку испитиваних првотелки

Састојак (kg)	Период у односу на дан тељења		
	-60. дан до -20. дан	-20. дан до -0. дан	0. дан до +40.дан
Сено луцерке	2,00	2,00	1,50
Силажа кукуруза	10,0	10,0	15,0
Сирови репин резанац	2,0	2,0	3,0
Слама	3,0	0,5	0,7
Сенажа луцерке	2,0	2,0	3,0
Сенажа/силажа житарица	6,0	2,0	-
Концентрат	0,5	2,0	4,0
Меласа	-	0,5	1,0
Гриз	-	0,2	1,5
Сојина погача	-	0,2	1,5
Протектирана маст	-	0,2	0,4
Зрно кукуруза	-	1,0	2,0
Сунцокретова сачма	1,2	1,0	-
Сточна со			0,05
Укупно (kg):	26,70	23,60	33,65

4.1.2. Препарат органски модификованог клиноптилолита Minazel Plus®

Minazel Plus® је препарат органски модификованог клиноптилолита који се састоји од минералне и органске компоненте од којих у дефинисаном технолошком поступку, као резултат јонске размене између неорганских катјона на површини минерала и органских катјона који се додају током процеса производње, настаје органокомплекс. Минералну компоненту овог препарата површински модификованог зеолита чине клиноптилолит (минимално 85%) уз мали удео алуминосиликата (максимум 5%), кварца (максимум 5%) и других минерала глине (од 5-10%). Хемијски састав препарата приказан је у табели 4.1.2., а дистрибуција величине честица приказана је у табели 4.1.3. Капацитет размене катјона је 140 meqM⁺/ 100 g.

Наведени подаци о препарату Minazel Plus[®] добијени су од произвођача Patent Co., Србија.

Табела 4.1.2. Хемијски састав органски модификованог клиноптилолита Minazel Plus[®]

Конституент	Количина
SiO ₂	68.98 %
Al ₂ O ₃	11.14 %
CaO	3.65 %
Fe ₂ O ₃	1.73 %
As	3.171 ppm
Pb	12.90 ppm
Cd	0.013 ppm
Sb	0.053 ppm

Табела 4.1.3. Величина честица органски модификованог клиноптилолита Minazel Plus[®]

Величина пора (mm)	Маса фракције (g)	Удео фракције (%)
> 0.3	7.73	7.81
> 0.2	16.57	16.73
> 0.16	22.66	22.88
> 0.10	30.86	31.17
> 0.08	6.16	6.22
< 0.08	15.04	15.19
Укупно	99.02	100

4.2. Методе рада

4.2.1. Колострум

Од свих крава првотелки укључених у оглед анализирани су узорци колострума из прве четири муже после тељења. Узорци су узимани 2-3 сата након тељења, 12., 24. и 36. сата након тељења и означени су редом као 1., 2., 3. и 4. колострум. Након сваке муже измерена је укупна запремина колострума и

узимана су по три узорка колострума (бр. 1, бр. 2 и бр. 3) у пластичне стерилне посуде запремине 200 mL означене идентификационим бројем животиње. Узорак бр. 1 анализиран је 1 сат након узимања дигиталним Вгix рефрактометром (Atago Co. Ltd., Токио, Јапан) у циљу процене квалитета колострума на основу очитаног % Вgix-а. Након извршене анализе, узорак је замрзаван на -20 °C и чуван до одређивања концентрације укупних колостралних IgG методом радијалне имунодифузије, применом комерцијалних пакета (RID kit, The Binding Site group Ltd, Бирмингем, Велика Британија). Преостала два узорка су првог сата након узимања такође замрзавана и чувана на -20 °C до даљих анализа. Након одмрзавања из узорка бр. 2 изолован је колострални серум за анализу протеинских фракција методом агарозне гел електрофорезе. У изолованом колостралном серуму одређивана је концентрација укупних колостралних протеина биуретском методом. Узорак бр. 3 коришћен је за анализу хемијског састава колострума.

4.2.2. Издвајање колостралног серума

Колострални серум је издвајан након одмрзавања узорака колострума и одстрањивања масти и казеина. Одмрзавање узорака је рађено у воденом купатилу на 37 °C, до постизања температуре колострума од 20 °C. Узорци су затим центрифуговани 20 min на 2000 x g након чега је површински слој масти уклоњен вакумском аспирацијом. Узорак је затим пренет у чисте кивете и казеин је преципитиран додавањем по 7 капи (приближно 175 µL) сирила на запремину од 10 mL узорка. Садржај кивете је хомогенизован благим мућкањем након чега су узорци инкубирани 30 min на 37 °C и поново центрифуговани 15 min на 3000 x g . Издвојени колострални серум је подељен у аликвоте од 2 mL и замрзнут на -20 °C до даљих анализа.

4.2.3. Крвни серум

Узимање узорака крви извршено је пункцијом *v. jugularis* непосредно пре почетка огледа (20±5 дана пред тељење), 7±3 дана пред тељење, 1., 2. и 7. дана након тељења. Код свих животиња узорковање је вршено увек у исто

време, 3 до 4 сата након давања јутарњег obroka, како би се избегао утицај дневног ритма и узимања obroka на резултате анализа.

Узорци крви су узимани у стерилне стандардне вакутајнере без антикоагуланса. Након узимања, узорци су остављани да спонтано коагулишу на собној температури до времена достављања у лабораторију (до 2 сата), након чега је серум издвојен центрифуговањем 20 min на 2000 x g. Узорци крвног серума су замрзавани на -20 °C до извођења анализа.

4.2.4. Одређивање концентрације одабраних биохемијских параметара крви

У узорцима крвног серума у интервалима 20 ± 5 дана пред тељење, 7 ± 3 дана пред тељење и 2. дана након тељења третиране и контролне групе, одређивана је концентрација укупних протеина, албумина, бета хидрокси бутерне киселине (енглески: *beta-hydroxi butiric acid*; ВНВ), урее, глукозе, триглицерида, холестерола, Са, Mg и P. За анализу ових параметара крви коришћени су следећи комерцијални тест пакети: ВНВ (Randox, Велика Британија); уреа, глукоза, холестерол и P (Bioanalitika, Србија); триглицериди, Са и Mg (BioSystem, Шпанија). Анализе су рађене на аутоматском биохемијском анализатору (Analyzer A15, BioSystem, Барселона, Шпанија).

4.2.5. Одређивање концентрације укупних протеина у колостралном и крвном серуму

Концентрација укупних протеина у колостралном серуму одређивана је биуретском методом рађеном по методи коју је описао Gornall (1949). За извођење методе коришћени су: биуретски реагенс (водени раствор 0,6% K-Na тартарата, 0,15% CuSO₄ и 0,75 mol/L NaOH), физиолошки раствор (0,9 % NaCl) и говеђи серум албумин (енглески: *bovine serum albumin*; BSA).

Непосредно пре почетка рада направљени су стандардни раствори BSA у концентрацији 5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,62 mg/mL и 0,31 mg/mL. Узорци колостралног серума 1. и 2. колострума разблаживани су 40 пута, а узорци колостралног серума 3. и 4. колострума разблаживани су 20 пута у

физиолошком раствору. Узорци крвног серума су разблаживани 40 пута у физиолошком раствору.

Метода је извођена тако што је на 2 mL стандардних раствора BSA, разблажених узорака колостралног серума и физиолошког раствора (слепа проба) додавано по 8 mL биуретског реагенса. Садржај епрувета је хомогенизован благим окретањем и остављен да стоји на собној температури 30 min, након чега је мерена апсорбанција љубичастог реакционог продукта на 520 nm (A_{520}). На основу измерене A_{520} стандардних раствора, коришћењем *MS Office Excel* програмског пакета конструисана је стандардна права зависности A_{520} од концентрације протеина и израчуната је једначина праве. На основу очитаних вредности A_{520} узорака колостралних серума и крвних серума, из једначине праве израчунате су концентрације протеина у њима.

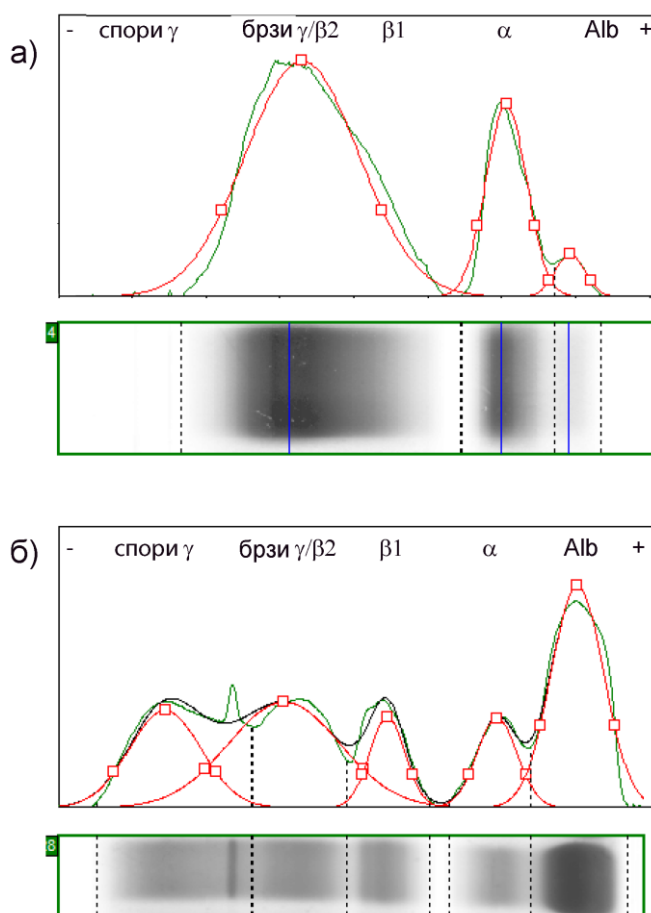
4.2.6. Агарозна електрофореза протеина (АЕП) колостралног и крвног серума и одређивање концентрације протеина у главним електрофоретским фракцијама

Концентрација γ глобулина у узорцима колостралног и крвног серума одређена је након електрофоретског раздвајања протеина у гелу 1% агарозе дебљине 0,1 mm, по методи коју је описао Johansson (1972). Као пуфер за електрофорезу коришћен је 92 mM веронални пуфер, pH 8,6. АЕП је рађена у апарату за хоризонталну електрофорезу Multiphor II (LKB, Шведска) који има систем за хлађење текућом водом. Електрофореза је рађена тако што су узорци неразблажених колостралних и крвних серума у запремини од 3 μ L уношени у резервоаре у гелу разливеном на стакленим плочама димензије 76x26 mm и након потпуног дифундовања у гел излагани дејству електричног поља јачине 6 mA по узорку, у трајању 40-50 минута. Истовремено је рађена електрофореза 8 узорака, а као маркер тока електрофорезе служио је узорак нормалног хуманог серума обојен бромфенол плавим. По завршеном електрофоретском раздвајању, гелови су осушени загревањем на 65 °C, истовремено фиксирани и обојени раствором комаси плавог (0,25% комаси плаво R-250 растворен у 10% сирћетној киселини и 45% метанолу; инкубација 16-18 сати), обезбојени раствором сирћетне киселине у метанолу и осушени на ваздуху. Релативни

удео, тј. проценат главних електрофоретских фракција (албумина и α , β и γ глобулина одређен је дензитометријском анализом електрофорезограма помоћу Image Master TotalLab v1.11 софтвера (Amersham Pharmacia Biotech, Упсала, Шведска) (слика 4.2.6.). Концентрација протеина у електрофоретским фракцијама израчуната је на основу укупне концентрације протеина по једначини:

Концентрација протеина у електрофоретској фракцији (g/L) =

Релативни удео (%) фракције x концентрација укупних протеина (g/L).



Слика 4.2.6. Електрофореза протеина а) колостралног серума и б) крвног серума првотелки у гелу агарозе и дензитометријско одређивање релативне заступљености/релативног удела (%) електрофоретских фракција.

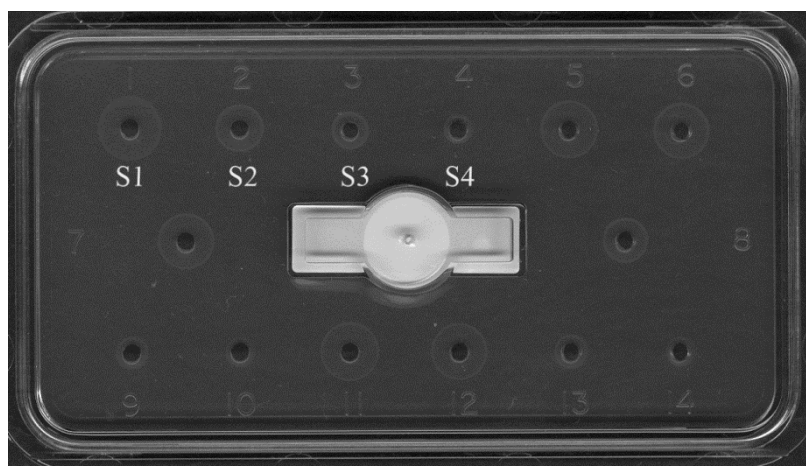
α - α глобулини, β - β глобулини, γ – γ глобулини; зелена линија: интензитет фракција одређен дензитометријском анализом; црвена линија: деконволуција дензитометријског записа.

4.2.7. Одређивање концентрације IgG у колоструму радијалном имунодифузијом (RID тест)

Концентрација IgG у колострумима првотелки одређивана је методом радијалне имунодифузије, применом комерцијалног RID кита (*Bovine IgG NL BINDARID*, The Binding Site group Ltd, Бирмингем, Велика Британија) у чијем саставу се налазе RID плоче са 14 бунарића у агарози са инкорпорисаним моноспецифичним антителима на говеђе IgG и раствор говеђих IgG познате концентрације (IgG стандард). RID плоче су чуване на температури од 4 °C до момента употребе.

Метода је изведена по упутству произвођача уз неопходне модификације које су биле унете у складу са концентрацијом IgG у анализираним узорцима. Непосредно пре почетка рада направљен је раствор изотоничног фосфатног пуфера (енглески: *phosphate buffered saline*; PBS; 137mM NaCl, 1,5mM KН₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄×2H₂O, 2,7 mM KCl). Узорци колострума су одмрзнути у воденом купатилу на 37 °C и загрејани до температуре од 20 °C, након чега су хомогенизовани благим мућкањем. Узорци колострума су разблаживани PBS-ом, и то узорци 1. и 2. колострума 150 пута, а узорци 3. и 4. колострума 40 пута. Избор разблажења зависио је од претходно познате концентрације γ глобулина у колостралним серумима које су одређене агарозном гел електрофорезом, како би осигурали да формиран преципитацијски прстен буде у распону стандардних вредности. Стандардни раствори IgG концентрација 2,5 g/L, 1,25g/L, 0,62 g/L и 0,31 g/L су прављени серијским разблаживањем IgG стандарда. Пре наношења узорака и стандарда, плоче су темперирани стајањем на собној температури 15 min. У бунариће плоча наношени су стандардни раствори IgG и разабалежени колоструми у запремини од 5 μ L. Након тога, плоче су инкубиране 72 сата на собној температури 20 до 25 °C. Након истека овог времена, као резултат реакција антигена (говеђеих IgG) из узорка и антитела (антитела на говеђе еритроците) инкорпорисаних у агарозу, формирају се имунокомплекси који се виде као преципитациони кругови чији је пречник директно пропорционалан концентрацији IgG у узорку (слика 4.2.7.).

Пречник преципитационих кругова одређен је Image Master Total Lab TL 120 софтвером (GE Health Care Life Science, САД). На основу измерених пречника кругова за стандарне растворе говеђих IgG, коришћењем *Excel* програмског пакета конструисана је стандардна права зависности пречника кругова стандарда од концентрације IgG и израчуната је једначина праве. На основу измерених пречника преципитационих кругова узорака колострума, из једначине праве израчунате су концентрације IgG у њима.



Слика 4.2.7. Одређивање концентрације колостралних IgG RID тестом. Бунарићи 1-4: Стандардни раствори говеђих IgG концентрације 2,5 g/L (S1), 1,25 g/L (S2), 0,62 g/L (S3) и 0,31 g/L (S4). Бунарићи 5-14: разблажени узорци колострума.

4.2.8. Хемијске анализе колострума

Анализе хемијског састава колострума урађене су на Катедри за хигијену и технологију намирница анималног порекла на Факултету ветеринарске медицине, Универзитета у Београду.

Узорци колострума отапани су у воденом купатилу на 37 °C до постигнуте температуре колострума на 20 °C и хомогенизовани благим мућкањем. Код свих животиња третиране и контролне групе из свих узорака колострума одређивана је вредност рН, затим релативни садржај (%) суве материје, протеина и масти. Релативни садржај (%) воде и суве материје без масти израчунати су на основу измерених вредности суве материје и масти. Вредност рН одређивана је потенциометријском методом по стандарду AS 2300.1.6-210 на апарату Ehtech A922809. Садржај протеина (%) је одређен

волуметријски, методом по Кјелдалу (Kjeldahl) одређивањем садржаја азота (ISO 8968-1:2014). Током извођења ове методе коришћен је апарат за минерализацију узорака (Gerhardt, Kjeldatherm KB/KBL, Немачка) и апарат за дестилацију узорака (Gerhardt, VaroDest 20, Немачка). Садржај суве материје (%) одређен је гравиметријском анализом методом сушења на 102 ± 2 °C (Правилник Службени лист СФРЈ 32/1983 - метода I/4). Одређивање садржаја масти у колоструму одређено је ацидобутирометријском методом по Герберу (Gerber) (Правилник Службени лист СФРЈ 32/1983 - метода I/3). Током извођења ове методе за центрифуговање узорака коришћена је центрифуга по Герберу (СЕВО 65, Берлин, Немачка) а за отапање бутирометара коришћено је водено купатило Funke Gerber WB436-D (Берлин, Немачка).

4.2.9. Рефрактометријска анализа колострума

Рефрактометријском анализом колострума, на основу измерене рефракције која је пропорционална концентрацији протеина (Quigley и сар., 2013) процењиван је квалитет колострума. Рефракција свежих узорака 1., 2., 3. и 4. колострума мерена је дигиталним Brix рефрактометром (Atago Co. Ltd., Токио, Јапан). Опсег Brix вредности (Brix%) овог рефрактометара је 0 до 85 %. Као што је наведено у упутству произвођача, непосредно пре почетка извођења анализе рефрактометар је калибрисан дестилованом водом, као и пре анализе сваког узорка колострума. Узорци колострума су хомогенизовани благим мућкањем а затим је на призму рефрактометра додато око 500 μ L узорка и прочитана је вредност Brix (%).

4.3. Статистичка обрада података

Резултати испитивања обрађени су стандардним статистичким методама коришћењем *GraphPad Prism 5* програмског пакета. Израчунате су средња вредност, стандардна девијација, стандардна грешка, медијана, минимална и максимална вредност и коефицијент варијације у огледним групама. Резултати су груписани у статистичке серије и приказани у виду табела и хистограма. За оцену статистичке значајности разлика средњих вредности/медијана анализираних група примењен је Студентов Т-тест, односно Mann-Whitney U-

тест, где је вредност вероватноће (p) мања од 0,05 означена као статистички значајна. За утврђивање корелационе зависности анализираних параметара коришћена је линеарна корелациона анализа, а фактори корелације (r) и вероватноћа (p) израчунате су помоћу *Origine Pro8* програмског пакета. Дијагностичке карактеристике V_{rix} методе (специфичност, сензитивност, позитивна предиктивна вредност (ППВ) и негативна предиктивна вредност (НПВ) израчуне су на основу поређења са резултатима концентрације IgG одређене RID методом дефинисаном као „златним стандардом“. По методи коју су описали Biemann и сар., (2010), предиктивне вредности за 1. колострум израчунате су на основу граничне вредности од 85g/L; за 1. и 2. колострум, гранична вредност концентрације IgG је била 50g/L (најнижа концентрација IgG која дефинише колострум доброг квалитета; Godden, 2008). Ове вредности су поређене са вредностима V_{rix} -а од 18%, 20%, 22% и 24%. Тестирањем сваке од ових вредности V_{rix} % за наведене концентрације IgG, вредности V_{rix} -а су описане као: тачно позитивне, лажно позитивне, тачно негативне и лажно негативне.

Сензитивност је израчуната по формули:

$$\text{Сензитивност (\%)} = [\text{тачно позитивне}/(\text{тачно позитивне}+\text{лажно негативне})] \times 100;$$

Специфичност је израчуната по формули:

$$\text{Специфичност (\%)} = [\text{тачно негативне}/(\text{тачно негативне}+\text{лажно позитивне})] \times 100;$$

ППВ је израчуната по формули:

$$\text{ППВ (\%)} = [\text{тачно позитивне}/(\text{тачно позитивне}+\text{лажно позитивне})] \times 100;$$

НПВ је израчуната по формули:

$$\text{НПВ (\%)} = [\text{тачно негативне}/(\text{тачно негативне}+\text{лажно негативне})] \times 100.$$

5. РЕЗУЛТАТИ

У овој студији приказани су резултати утицаја пероралног давања органски модификовног клиноптилолита на квалитет колострума првотелки. Квалитет колострума је процењиван на основу анализе физичко-хемијских, биохемијских и имунохемијских карактеристика пуног колострума и колостралног серума. Утицај примењеног третмана на укупно здравље првотелки процењен је на основу резултата анализе главних биохемијских/метаболичких параметара периферне крви.

5.1. Утицај пероралног давања органски модификовног клиноптилолита на квалитет колострума првотелки

Испитивања су вршена на високо гравидним првотелкама холштајн-фризијске расе које су биле подељене су у две групе: 1) третирану групу, које су почевши од 20 ± 5 дана пре очекиваног термина тељења до два дана после тељења, свакодневно добијале органски модификовани клиноптилолит и 2) контролну групу. Од свих првотелки укључених у оглед анализирани су узорци колострума из прве четири муже после тељења. Узорци су узимани 2-3 сата након тељења, 12., 24. и 36. сата након тељења и означени су редом као 1., 2., 3. и 4. колострум.

5.1.1. Процент суве материје у пуном колоструму

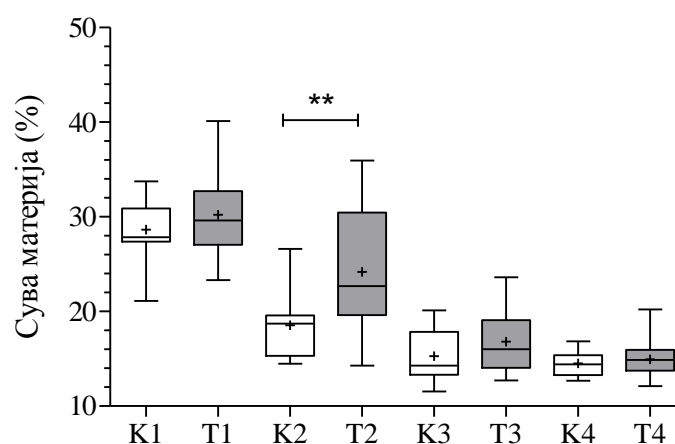
Вредности процента (%) суве материје ($\bar{x} \pm SD$, Me) у узорцима 1., 2., 3. и 4. колострума контролне и третиране групе првотелки као и основне статистичке мере варијације приказани су у табели 5.1.1. Подаци приказани у табели 5.1.1. показују да је највиша средња вредност процента суве материје забележена у 1. колоструму третиране групе првотелки ($30,2 \pm 4,4\%$). Најнижа средња вредност процента суве материје забележена је у 4. колоструму контролне групе ($14,5 \pm 1,3\%$).

Табела 5.1.1. Вредности процента (%) суве материје у колоструму првотелки контролне и групе третиране органски модификованим клиноптилолитом.

	% Суве материје							
	Колоструми							
	1.		2.		3.		4.	
	К	Т	К	Т	К	Т	К	Т
\bar{x}	28,7	30,2	18,5	24,2	15,2	16,8	14,5	14,9
Me	27,8	29,6	18,7	22,7	14,2	16,0	14,4	14,9
SD	3,2	4,4	3,4	6,4	2,6	3,4	1,3	1,8
SE	0,8	1,0	0,8	1,4	0,7	0,8	0,3	0,4
Iv	21,1- 33,7	23,3- 40,1	14,5- 26,6	14,3- 36,0	11,6- 20,1	12,7- 23,6	12,7- 16,8	12,1- 20,2
Интеркв. разлика	27,4- 30,9	27,1- 32,7	15,3- 19,6	19,6- 30,5	13,3- 17,8	14,0- 19,1	13,3- 15,4	13,8- 16,0
C _v %	11,2	14,4	18,1	26,4	17,0	20,3	9,0	12,3

К- контролна група првотелки (n=16), Т- третирана група првотелки (n=20); \bar{x} - средња вредност; Me - медијана; SD - стандардна девијација; SE - стандардна грешка; Iv- интервал варијације; C_v - коефицијент варијације.

Статистичка значајност разлика средњих вредности/медијана процента суве материје у колострумима између контролне и третиране групе животиња приказана је на слици 5.1.1. Подаци приказани на овој слици показују да је средња вредност процента суве материје у 2. колоструму третиране групе првотелки (24,2±6,4%; Me=22,7%) била статистички значајно виша (за 30%; p<0,01; т-тест) у односу на проценат средње вредности суве материје у контролној групи (18,5±3,4%; Me=18,7%). У анализираним узорцима 1, 3. и 4. колострума, средња вредност процента суве материје код првотелки третиране групе је била нешто виша у односу на контролну групу, али та разлика није била статистички значајна.



Слика 5.1.1. Утицај пероралног давања органски модификовног клиноптилолита на проценат суве материје у колоструму првотелки.

На хистограмима су приказани: средња вредност (+); медијана, као линија унутар хистограма; вредност унутар правоугаоника приказује опсег од 25% до 75% вредности анализираних група, граничници означавају распон од минималне до максималне вредности. (**) статистички значајна разлика третиране у односу на контролну групу, $p < 0,01$.

5.1.2. Процент масти у пуном колоструму

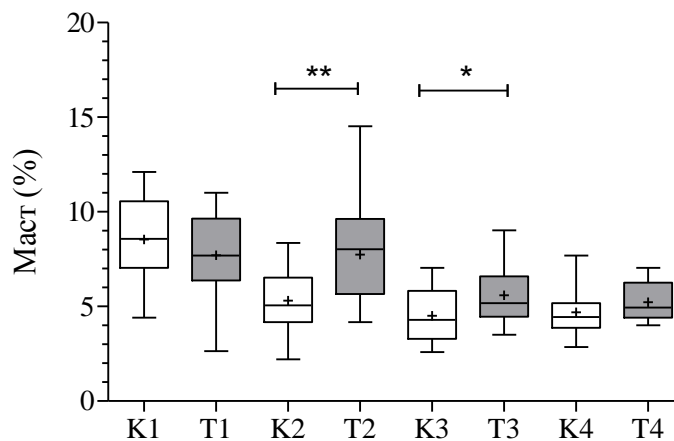
Вредности процента (%) масти ($\bar{x} \pm SD$, Me) у узорцима 1., 2., 3. и 4. колострума контролне и третиране групе првотелки као и основне статистичке мере варијације приказани су у табели 5.1.2. Подаци приказани у овој табели показују да је највиша средња вредност процента масти забележена код контролне групе првотелки ($8,5 \pm 2,4\%$) у 1. колоструму. У истој групи, у 3. колоструму, забележена је и најнижа средња вредност процента масти ($4,5 \pm 1,4\%$).

Статистичка значајност разлика средњих вредности/медијана процента масти у колострумима између контролне и третиране групе животиња приказана је на слици 5.1.2.

Табела 5.1.2. Вредности процента (%) масти у колоструму првотелки контролне и групе третиране органски модификованим клиноптилолитом.

	% Масти							
	Колоструми							
	1.		2.		3.		4.	
	К	Т	К	Т	К	Т	К	Т
\bar{x}	8,5	7,7	5,3	7,7	4,5	5,6	4,7	5,2
Me	8,6	7,7	5,1	8,0	4,3	5,2	4,4	5,0
SD	2,4	2,2	1,6	2,6	1,4	1,7	1,2	1,0
SE	0,6	0,5	0,4	0,66	0,3	0,4	0,3	0,2
I_v	4,4- 12,1	2,6- 11,0	2,2- 8,4	4,2- 14,5	2,6- 7,0	3,5- 9,0	2,9- 7,7	4,0- 7,0
Интеркв. разлика	7,0- 10,6	6,4- 9,6	4,2- 6,5	5,7- 9,6	3,3- 5,8	4,5- 6,6	3,9- 5,2	4,4- 6,3
C_v %	27,6	28,2	29,7	33,0	30,5	29,6	26,0	18,3

К- контролна група првотелки (n=16), Т- третирана група првотелки (n=20); \bar{x} - средња вредност; Me - медијана; SD - стандардна девијација; SE - стандардна грешка; I_v - интервал варијације; C_v - коефицијент варијације.



Слика 5.1.2. Утицај пероралног давања органски модификовног клиноптилолита на проценат масти у колоструму првотелки.

На хистограмима су приказани: средња вредност (+); медијана, као линија унутар хистограма; вредност унутар правоугаоника приказује опсег од 25% до 75% вредности анализираних група, граничници означавају распон од минималне до максималне вредности. (**) и (*) статистички значајна разлика третиране у односу на контролну групу, $p < 0,01$ и $p < 0,05$.

Подаци приказани на слици 5.1.2. указују да је средња вредност процента масти у 2. колоструму третиране групе првотелки ($7,7 \pm 2,6\%$; $Me=8,0\%$) била статистички значајно виша (за 45%; $p < 0,01$; т-тест), у односу на проценат средње вредности масти одређеног у контролној групи ($5,3 \pm 1,6\%$; $Me=5,1\%$). Статистички значајна разлика забележена је и у 3. колоструму где је средња вредност процента масти била значајно виша (за 24%; $p < 0,05$; т-тест) код третиране ($5,6 \pm 1,7\%$; $Me=5,2\%$) у односу на контролну групу првотелки ($4,5 \pm 1,4\%$; $Me=4,3\%$).

5.1.3. Вредност рН у пуном колоструму

Вредности рН ($\bar{x} \pm SD$, Me) у узорцима 1., 2, 3. и 4. колострума контролне и третиране групе првотелки као и основне статистичке мере варијације приказани су у табели 5.1.3. На основу података приказаних у овој табели може се видети да је у контролној групи у 4. колоструму забележена највиша средња вредност рН ($6,36 \pm 0,13$). Најнижа средња вредност рН забележена је у 1. колоструму третиране групе првотелки ($6,17 \pm 0,09$).

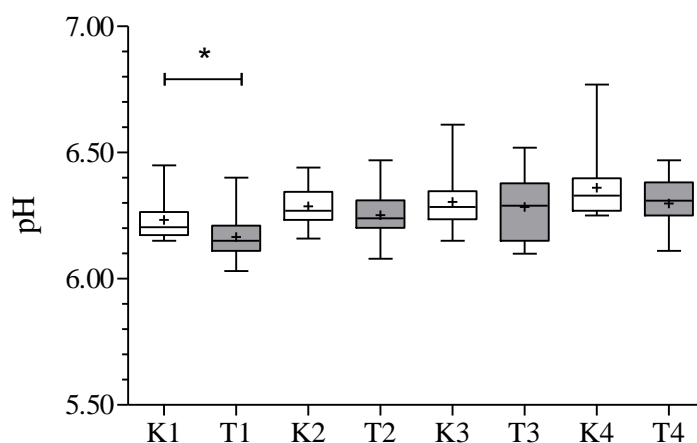
Статистичка значајност разлика средњих вредности/медијана рН колострума између контролне и третиране групе животиња приказана је на слици 5.1.3.

Подаци приказани на слици 5.1.3. указују да је средња вредност рН у 1. колоструму третиране групе животиња ($6,17 \pm 0,09$; $Me=6,15$) била статистички значајно нижа (за 1%; $p < 0,05$; Mann Whitney U-тест), у односу на средњу вредност рН одређену у контролној групи ($6,23 \pm 0,08$; $Me=6,20$).

Табела 5.1.3. Вредности рН колострума првотелки контролне и групе третиране органски модификованим клиноптилолитом.

	рН							
	Колоструми							
	1.		2.		3.		4.	
	К	Т	К	Т	К	Т	К	Т
\bar{x}	6,23	6,17	6,29	6,25	6,30	6,28	6,36	6,30
Me	6,20	6,15	6,27	6,24	6,28	6,29	6,33	6,31
SD	0,08	0,09	0,08	0,09	0,11	0,13	0,13	0,11
SE	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,02
I_v	6,15- 6,45	6,03- 6,40	6,16- 6,44	6,08- 6,47	6,15- 6,61	6,10- 6,52	6,25- 6,77	6,11- 6,47
Интеркв. разлика	6,17- 6,27	6,11- 6,21	6,23- 6,35	6,20- 6,31	6,24- 6,35	6,15- 6,38	6,27- 6,40	6,25- 6,38
C_v %	1,32	1,38	1,29	1,36	1,77	2,07	2,05	1,68

К- контролна група првотелки (n=16), Т- третирана група првотелки (n=20); \bar{x} - средња вредност; Me - медијана; SD - стандардна девијација; SE - стандардна грешка; I_v - интервал варијације; C_v - коефицијент варијације.



Слика 5.1.3. Утицај пероралног давања органски модификовног клиноптилолита на вредности рН колострума првотелки.

На хистограмима су приказани: средња вредност (+); медијана, као линија унутар хистограма; вредност унутар правоугаоника приказује опсег од 25% до 75% вредности анализираних група, граничници означавају распон од минималне до максималне вредности. (*) статистички значајна разлика третиране у односу на контролну групу, $p < 0,05$.

5.1.4. Процент воде у пуном колоструму

Вредности процента (%) воде ($\bar{x} \pm SD$, Me) у узорцима 1., 2., 3. и 4. колострума контролне и третиране групе првотелки као и основне статистичке мере варијације приказани су у табели 5.1.4. На основу података приказаних у овој табели може се запазити да је код контролне групе животиња у 4. колоструму забележена највиша средња вредност процента воде ($85,5 \pm 1,3\%$). Најнижа средња вредност процента воде забележена је у 1. колоструму код третиране групе животиња ($69,8 \pm 4,4\%$).

Табела 5.1.4. Вредности процента (%) воде у колоструму првотелки контролне и групе третиране органски модификованим клиноптилолитом.

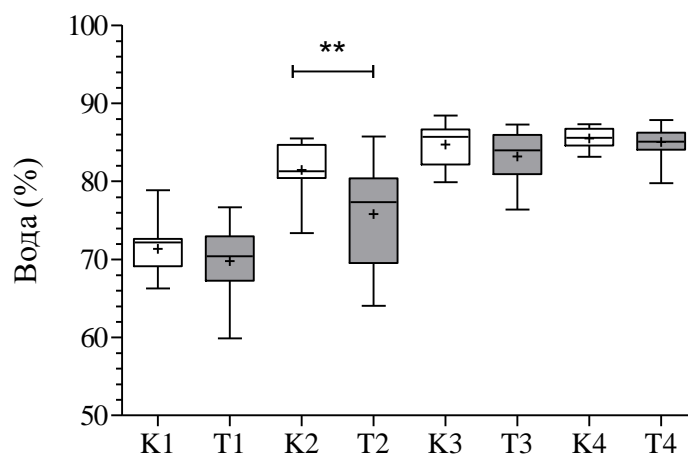
	% Воде							
	Колоструми							
	1.		2.		3.		4.	
	К	Т	К	Т	К	Т	К	Т
\bar{x}	71,3	69,8	81,5	75,8	84,8	83,2	85,5	85,1
Me	72,2	70,4	81,3	77,3	85,7	83,8	85,6	85,1
SD	3,20	4,4	3,4	6,4	2,6	3,4	1,3	1,8
SE	0,8	1,0	0,8	1,4	0,7	0,8	0,3	0,4
I_v	66,3- 78,9	59,9- 76,7	73,4- 85,5	64,1- 85,7	79,9- 88,4	76,4- 87,3	83,2- 87,3	79,8- 87,9
Интеркв. разлика	69,1- 72,6	67,3- 73,0	80,4- 84,7	69,5- 80,4	82,2- 86,7	80,9- 86,0	84,6- 86,7	84,1- 86,3
C_v %	4,5	6,2	4,1	8,4	3,1	4,1	1,5	2,2

К- контролна група првотелки (n=16), Т- третирана група првотелки (n=20); \bar{x} - средња вредност; Me - медијана; SD - стандардна девијација; SE - стандардна грешка; I_v - интервал варијације; C_v - коефицијент варијације.

Статистичка значајност разлика средњих вредности/медијана процента воде у колострумима између контролне и третиране групе животиња приказана је на слици 5.1.4.

Анализом статистичке значајности утврђених разлика средњих вредности процента воде у колострумима између контролне и третиране групе животиња, на слици 5.1.4. може се уочити да постоји висока статистичка значајност у 2. колоструму, при чему је код третиране групе првотелки средња вредност процента воде ($75,8 \pm 6,4\%$; Me=77,3%) била значајно нижа (за 7%;

$p < 0,01$; т-тест) у односу на средњу вредност процента воде одређеног у контролној групи ($81,5 \pm 3,4\%$; $Me = 81,3\%$).



Слика 5.1.4. Утицај пероралног давања органски модификовног клиноптилолита на проценат воде у колоструму првотелки.

На хистограмима су приказани: средња вредност (+); медијана, као линија унутар хистограма; вредност унутар правоугаоника приказује опсег од 25% до 75% вредности анализираних група, граничници означавају распон од минималне до максималне вредности. (**) статистички значајна разлика третиране у односу на контролну групу, $p < 0,01$.

5.1.5. Процент суве материје без масти у пуном колоструму

Израчунате вредности процента (%) суве материје без масти ($\bar{x} \pm SD$, Me) у узорцима 1., 2., 3. и 4. колострума контролне и третиране групе првотелки као и основне статистичке мере варијације приказани су у табели 5.1.5. Процент суве материје без масти са највишом средњом вредношћу одређен је у 1. колоструму код третиране групе првотелки ($22,5 \pm 3,5\%$). Најнижа средња вредност процента суве материје без масти забележена је у истој групи животиња у 4. колоструму ($9,7 \pm 1,7\%$).

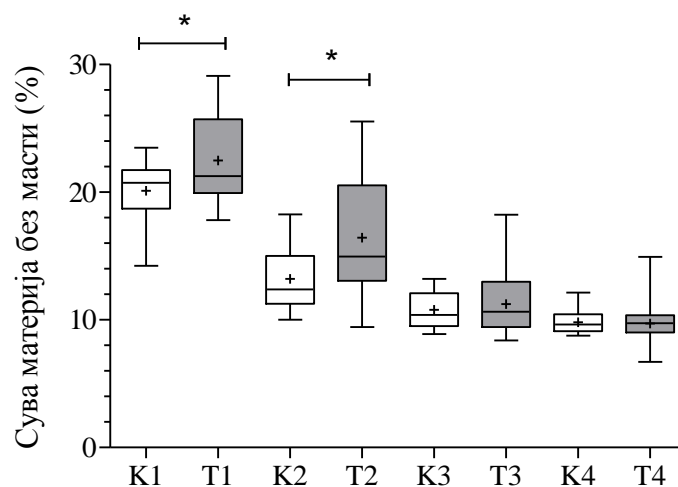
Табела 5.1.5. Вредности процента (%) суве материје без масти у колоструму првотелки контролне и групе третиране органски модификованим клиноптилолитом.

	% Суве материје без масти							
	Колоструми							
	1.		2.		3.		4.	
	К	Т	К	Т	К	Т	К	Т
\bar{x}	20,2	22,5	13,2	16,5	10,7	11,2	9,8	9,7
Me	20,7	21,3	12,4	15,0	10,4	10,7	9,6	9,8
SD	2,3	3,5	2,5	4,2	1,4	2,4	0,9	1,7
SE	0,6	0,8	0,6	0,9	0,4	0,5	0,2	0,4
I _v	14,2- 23,5	17,8- 29,1	10,0- 18,3	9,4- 25,5	8,9- 13,2	8,4- 18,2	8,8- 12,1	6,7- 15,0
Интеркв. разлика	18,7- 21,7	19,9- 25,7	11,3- 15,0	13,1- 20,5	9,5- 12,1	9,4- 13,0	9,1- 10,4	9,0- 10,4
C _v %	12,7	15,6	18,7	25,7	13,3	21,6	9,3	17,0

К- контролна група првотелки (n=16), Т- третирана група првотелки (n=20); \bar{x} - средња вредност; Me - медијана; SD - стандардна девијација; SE - стандардна грешка; I_v- интервал варијације; C_v - коефицијент варијације.

Статистичка значајност разлика средњих вредности/медијана процента суве материје без масти у колострумима између контролне и третиране групе животиња приказана је на слици 5.1.5.

Анализом статистичке значајности утврђених разлика средњих вредности процента суве материје без масти у колострумима између контролне и третиране групе животиња, на слици 5.1.5. може се уочити да постоји статистичка значајност у 1. и 2. колоструму. У 1. колоструму код третиране групе првотелки средња вредност процента суве материје без масти (22,5±3,5%; Me=21,3%) је била статистички значајно виша (за 11%; p<0,05; т-тест), у односу на средњу вредност истог параметра одређеног у контролној групи (20,2±2,3%; Me=20,7%). У 2. колоструму, такође код третиране групе животиња, утврђена је статистички значајно виша (за 25%; p<0,05; т-тест), средња вредност процента суве материје без масти (16,5±4,2%; Me=15,0%) у односу на средњу вредност истог параметра одређеног у контролној групи (13,2±2,5%; Me=12,4%).



Слика 5.1.5. Утицај пероралног давања органски модификовног клиноптилолита на проценат суве материје без масти у колоструму првотелки.

На хистограмима су приказани: средња вредност (+); медијана, као линија унутар хистограма; вредност унутар правоугаоника приказује опсег од 25% до 75% вредности анализираних група, граничници означавају распон од минималне до максималне вредности. (*) статистички значајна разлика третиране у односу на контролну групу, $p < 0,05$.

5.1.6. Процент протеина у пуном колоструму

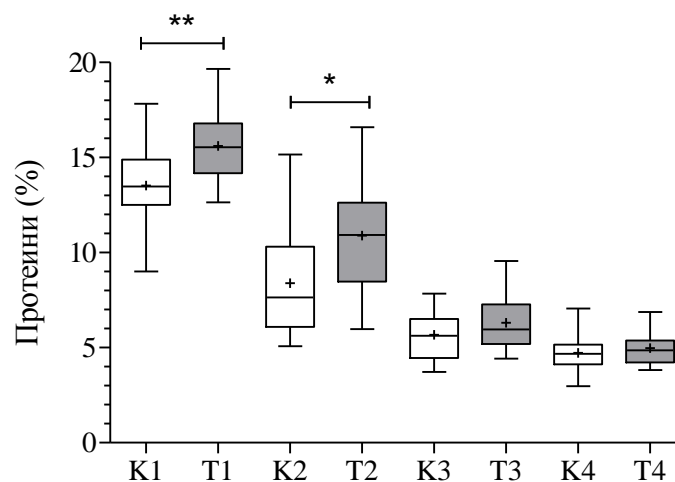
Вредности процента (%) ($\bar{x} \pm SD$, Me) у узорцима 1., 2., 3. и 4. колострума контролне и третиране групе првотелки као и основне статистичке мере варијације приказани су у табели 5.1.6. Код обе групе испитиваних животиња, средње вредности процента протеина у колоструму приказане у овој табели, показују тенденцију константног опадања са повећањем броја сати од тељења, односно времена узорковања колострума. Највиша средња вредност процента протеина забележена је у 1. колоструму код третиране групе ($15,6 \pm 1,9\%$) а најнижа у 4. колоструму код контролне групе првотелки ($4,7 \pm 1,0\%$).

Табела 5.1.6. Вредности процента (%) протеина у колоструму првотелки контролне и групе третиране органски модификованим клиноптилолитом.

	% Протеина							
	Колоструми							
	1.		2.		3.		4.	
	К	Т	К	Т	К	Т	К	З
\bar{x}	13,5	15,6	8,4	10,9	5,7	6,3	4,7	5,0
Me	13,5	15,5	7,6	10,9	5,6	6,0	4,7	4,9
SD	2,3	1,9	2,9	2,9	1,3	1,6	1,0	0,8
SE	0,6	0,4	0,7	0,7	0,3	0,4	0,3	0,2
I _v	9,0- 17,8	12,6- 19,7	5,1- 15,2	6,0- 16,6	3,7- 7,9	4,4- 9,6	3,0- 7,1	3,8- 6,9
Интеркв. разлика	12,5- 14,9	14,2- 16,8	6,1- 10,3	8,5- 12,6	4,5- 6,5	5,2- 7,3	4,1- 5,2	4,2- 5,4
C _v %	16,7	12,3	34,2	26,8	23,0	24,7	20,9	16,6

К- контролна група првотелки (n=16), Т- третирана група првотелки (n=20); \bar{x} - средња вредност; Me - медијана; SD - стандардна девијација; SE - стандардна грешка; I_v- интервал варијације; C_v - коефицијент варијације.

Статистичка значајност разлика средњих вредности/медијана процента протеина у колострумима између контролне и третиране групе животиња приказана је на слици 5.1.6. На овој слици се може запазити да је статистичка значајност разлика у средњим вредностима процента протеина у колоструму између контролне и третиране групе првотелки установљена у 1. и 2. колоструму. У 1. колоструму код третиране групе првотелки средња вредност процента протеина (15,6±1,9%; Me=15,5%) је била статистички значајно виша (за 15%; p<0,01; т-тест) у односу на средњу вредност истог параметра одређеног у контролној групи (13,5±2,3%; Me=13,5%). У 2. колоструму, такође код третиране групе животиња, утврђена је статистички значајно виша (за 30%; p<0,05; т-тест) средња вредност процента протеина (10,9±2,9%; Me=10,9%) у односу на средњу вредност истог параметра одређеног у контролној групи (8,4±2,9%; Me=7,6%).



Слика 5.1.6. Утицај пероралног давања органски модификовног клиноптилолита на проценат протеина у колоструму првотелки.

На хистограмима су приказани: средња вредност (+); медијана, као линија унутар хистограма; вредност унутар правоугаоника приказује опсег од 25% до 75% вредности анализираних група, граничници означавају распон од минималне до максималне вредности. (**) и (*) статистички значајна разлика третиране у односу на контролну групу, $p < 0,01$ и $p < 0,05$.

5.1.7. Процент Brix-a у пуном колоструму

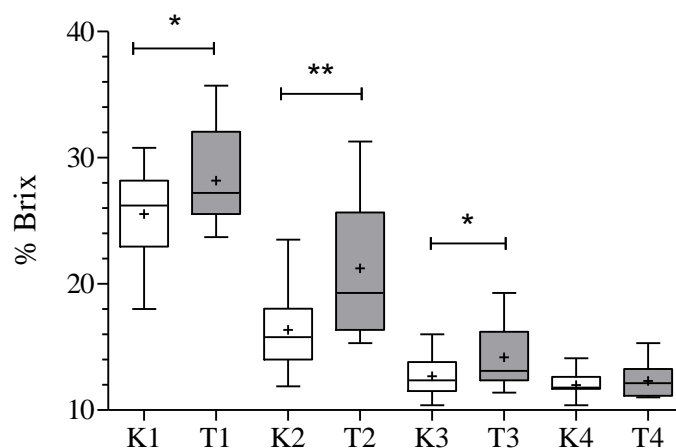
Вредности рефракције колострума измерене су Brix рефрактометром и изражене као проценат (%) Brix-a. Вредности % Brix-a ($\bar{x} \pm SD$, Me) у узорцима 1., 2., 3. и 4. колострума контролне и третиране групе првотелки као и основне статистичке мере варијације приказани су у табели 5.1.7. Средње вредности процента % Brix-a приказане у овој табели код обе групе испитиваних животиња показују тенденцију константног опадања са повећањем броја сати од тељења, односно времена узорковања колострума. Највиша средња вредност процента Brix-a забележена је у 1. колоструму код третиране групе ($28,2 \pm 3,5\%$ Brix) а најнижа у 4. колоструму код контролне групе првотелки ($12,0 \pm 0,9\%$ Brix).

Табела 5.1.7. Вредности процента Brix-а (% Brix) у колоструму првотелки контролне и групе третиране органски модификованим клиноптилолитом.

	% Brix							
	Колоструми							
	1.		2.		3.		4.	
	К	Т	К	Т	К	Т	К	Т
\bar{x}	25,5	28,2	16,4	21,2	12,7	14,2	12,0	12,3
Me	26,2	27,2	15,8	19,3	12,4	13,1	11,8	12,6
SD	3,4	3,5	3,3	5,3	1,7	2,5	0,9	1,2
SE	0,9	0,8	0,8	1,2	0,4	0,6	0,2	0,3
I_v	18,0- 30,8	23,7- 35,7	11,9- 23,5	15,3- 31,3	10,4- 16,0	11,4- 19,3	10,4- 14,1	11,0- 15,3
Интеркв. разлика	23,0- 28,2	25,6- 32,1	14,0- 18,0	16,4- 25,7	11,5- 13,8	12,4- 16,2	11,7- 12,7	11,1- 13,3
C_v %	13,3	12,5	19,7	24,7	13,1	17,7	7,2	9,7

К- контролна група првотелки (n=16), Т- третирана група првотелки (n=20); \bar{x} - средња вредност; Me - медијана; SD - стандардна девијација; SE - стандардна грешка; I_v - интервал варијације; C_v - коефицијент варијације.

Статистичка значајност разлика средњих вредности/медијана % Brix-а у колострумима између контролне и третиране групе животиња приказана је на слици 5.1.7. на којој се може запазити да је статистичка значајност разлика у средњим вредностима % Brix-а између контролне и третиране групе првотелки установљена у 1., 2., и 3. колоструму. Средња вредност % Brix-а у 1. колоструму код третиране групе животиња (28,2±3,5% Brix; Me=27,2% Brix) је била статистички значајно виша (за 11%; $p<0,05$; т-тест) у односу на средњу вредност % Brix-а одређену у контролној групи (25,5±3,4% Brix; Me=26,2% Brix). У 2. колоструму средња вредност % Brix-а код третиране групе првотелки (21,2±5,3% Brix; Me=19,3% Brix) је била статистички значајно виша (за 29%; $p<0,01$; т-тест) у односу на средњу вредност % Brix-а одређену у контролној групи (16,4±3,3% Brix; Me=15,8% Brix). У 3. колоструму, такође код третиране групе првотелки забележена је статистички значајно виша (за 12%; $p<0,05$; т-тест) средња вредност % Brix-а (14,2±2,5% Brix; Me=13,1% Brix) у поређењу са средњом вредношћу процента Brix-а одређену у контролној групи (12,7±1,7% Brix; Me=12,4% Brix).



Слика 5.1.7. Утицај пероралног давања органски модификовног клиноптилолита на проценат Brix-a у колоструму првотелки.

На хистограмима су приказани: средња вредност (+); медијана, као линија унутар хистограма; вредност унутар правоугаоника приказује опсег од 25% до 75% вредности анализираних група, граничници означавају распон од минималне до максималне вредности. (**) и (*) статистички значајна разлика третиране у односу на контролну групу, $p < 0,01$ и $p < 0,05$.

5.1.8. Концентрација укупних протеина у колостралном серуму

Вредности концентрације (g/L) укупних протеина у колостралном серуму одређених биуретском методом ($\bar{x} \pm SD$, Me) у узорцима 1., 2., 3. и 4. колострума контролне и третиране групе првотелки као и основне статистичке мере варијације приказани су у табели 5.1.8. Подаци приказани у овој табели показују да је највиша средња вредност концентрације укупних протеина забележена у 1. колоструму код третиране групе првотелки (150 ± 34 g/L). Најнижа средња вредност концентрације укупних протеина забележена је у 4. колоструму код контролне групе (20 ± 8 g/L). Код обе испитиване групе животиња може се запазити тренд константног опадања овог испитиваног параметра са повећањем броја сати од телења, односно времена узорковања колострума.

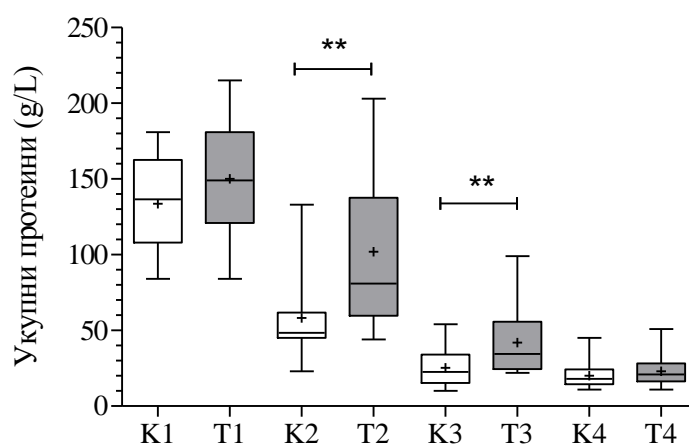
Табела 5.1.8. Концентрација укупних протеина (g/L) у колостралном серуму првотелки контролне и групе третиране органски модификованим клиноптилолитом.

	Концентрација протеина (g/L)							
	Колострални серуми							
	1.		2.		3.		4.	
	К	Т	К	Т	К	Т	К	Т
\bar{x}	134	150	58	102	25	42	20	23
Me	137	149	49	81	23	35	18	21
SD	30	34	27	49	12	22	8	10
SE	8	8	7	11	3	5	2	2
I_v	84-181	84-215	23-133	44-203	10-54	22-99	11-45	11-51
Интеркв. разлика	108-163	121-181	45-62	60-138	15-34	25-56	15-24	16-28
C_v %	23	23	46	48	48	53	40	43

К- контролна група првотелки (n=16), Т- третирана група првотелки (n=20); \bar{x} - средња вредност; Me - медијана; SD - стандардна девијација; SE - стандардна грешка; I_v - интервал варијације; C_v - коефицијент варијације.

Статистичка значајност разлика средњих вредности/медијана концентрације укупних протеина у колострумима између контролне и третиране групе животиња приказана је на слици 5.1.8.

Анализом статистичке значајности утврђених разлика средњих вредности концентрације укупних протеина у колостралним серумима између контролне и третиране групе животиња, на слици 5.1.8. може се уочити да постоји статистичка значајност у 2. и 3. колоструму. У 2. колоструму код третиране групе првотелки средња вредност концентрације укупних протеина (102 ± 49 g/L; Me=81 g/L) је била статистички значајно виша (за 76%; $p < 0,01$; Mann Whitney U-тест) у односу на средњу вредност истог параметра одређеног у контролној групи (58 ± 27 g/L; Me=49 g/L). У 3. колоструму, такође код третиране групе животиња, утврђена је статистички значајно виша (за 68%; $p < 0,01$; Mann Whitney U-тест) средња вредност концентрације укупних протеина (42 ± 22 g/L; Me=35 g/L) у односу на средњу вредност истог параметра одређеног у контролној групи (25 ± 12 g/L; Me=23 g/L).



Слика 5.1.8. Утицај пероралног давања органски модификовног клиноптилолита на концентрацију укупних протеина у колостралном серуму првотелки.

На хистограмима су приказани: средња вредност (+); медијана, као линија унутар хистограма; вредност унутар правоугаоника приказује опсег од 25% до 75% вредности анализираних група, граничници означавају распон од минималне до максималне вредности. (**) статистички значајна разлика третиране у односу на контролну групу, $p < 0,01$.

5.1.9. Концентрација γ глобулина у колостралном серуму

Релативна заступљеност (%) γ глобулина у укупним протеинима колостралног серума раздвојених у гелу агарозе је одређена дензитометријом. Концентрација γ глобулина (g/L) израчуната је на основу концентрације укупних протеина колостралног серума. Вредности концентрације (g/L) γ глобулина у колостралном серуму ($\bar{x} \pm SD$, Me) у узорцима 1., 2., 3. и 4. колострума контролне и третиране групе првотелки као и основне статистичке мере варијације приказани су у табели 5.1.9. Подаци приказани у овој табели показују да је највиша средња вредност концентрације γ глобулина забележена у 1. колоструму код третиране групе првотелки (111 ± 27 g/L). Најнижа средња вредност концентрације γ глобулина забележена је у 4. колоструму код контролне групе (9 ± 6 g/L). Такође, може се запазити тренд константног

опадања овог параметра са повећањем броја сати од телења, односно времена узорковања колострума код обе групе животиња које су биле у огледу.

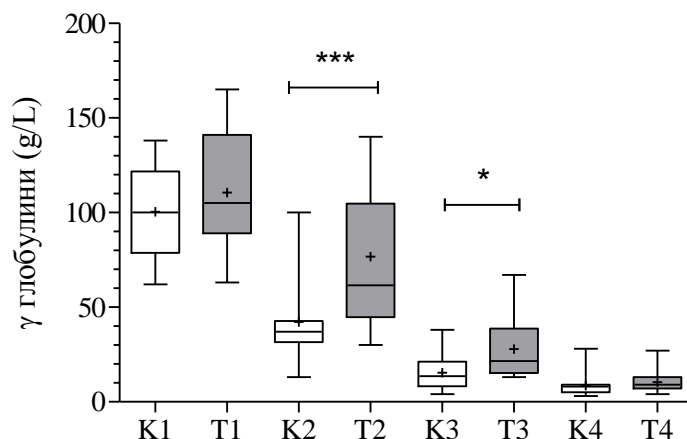
Табела 5.1.9. Концентрација γ глобулина (g/L) у колостралном серуму првотелки контролне и групе третиране органски модификованим клиноптилолитом: метод АЕП.

	γ глобулини (g/L)							
	Колострални серуми							
	1.		2.		3.		4.	
	К	Т	К	Т	К	Т	К	Т
\bar{x}	100	111	42	77	15	28	9	10
Me	100	105	37	62	14	22	8	9
SD	24	27	21	37	9	17	6	5
SE	6	6	5	8	2	4	1	1
I_v	62-138	63-165	13-100	30-140	4-38	13-67	3-28	4-27
Интеркв. разлика	79-122	89-141	32-43	45-105	8-21	15-39	5-9	7-13
C_v %	24	25	49	48	61	61	67	51

К- контролна група првотелки (n=16), Т- третирана група првотелки (n=20); \bar{x} - средња вредност; Me - медијана; SD - стандардна девијација; SE - стандардна грешка; I_v - интервал варијације; C_v - коефицијент варијације.

Статистичка значајност разлика средњих вредности/медијана концентрације γ глобулина у колостралним серумима између контролне и третиране групе животиња приказана је на слици 5.1.9. на којој се уочава да је статистичка значајност разлика у средњим вредностима концентрације γ глобулина у колостралном серуму установљена у 2. и 3. колоструму између контролне и третиране групе првотелки. У 2. колоструму код третиране групе првотелки средња вредност концентрације γ глобулина (77 ± 37 g/L; Me=62 g/L) је била статистички значајно виша (за 83%; $p < 0,001$; Mann Whitney U-тест) у односу на средњу вредност истог параметра одређеног у контролној групи (42 ± 21 g/L; Me=37 g/L). Мање статистички значајна разлика, установљена је у 3. колоструму такође код третиране групе животиња, при чему је средња вредност концентрације γ глобулина (28 ± 17 g/L; Me=22 g/L) била статистички

значајно виша (за 87%; $p < 0,05$; т-тест) у односу на средњу вредност истог параметра одређеног у контролној групи (15 ± 9 g/L; Me=14 g/L).



Слика 5.1.9. Утицај пероралног давања органски модификовног клиноптилолита на концентрацију γ глобулина у колостралном серуму првотелки.

На хистограмима су приказани: средња вредност (+); медијана, као линија унутар хистограма; вредност унутар правоугаоника приказује опсег од 25% до 75% вредности анализираних група, граничници означавају распон од минималне до максималне вредности. (***) и (*) статистички значајна разлика третиране у односу на контролну групу, $p < 0,001$ и $p < 0,05$.

5.1.10. Концентрација IgG у пуном колоструму

Концентрација IgG у пуном колоструму одређена је RID методом. Вредности концентрације (g/L) IgG ($\bar{x} \pm SD$, Me) у узорцима 1., 2., 3. и 4. колострума контролне и третиране групе првотелки као и основне статистичке мере варијације приказани су у табели 5.1.10. Код обе групе испитиваних животиња, средње вредности концентрације IgG у колоструму приказане у овој табели, показују тенденцију константног опадања са повећањем броја сати од тельења, односно времена узорковања колострума. Такође се могу запазити велике индивидуалне варијације и високе стандардне девијације, нарочито у 1. и 2. колоструму. Највиша средња вредност процента протеина забележена је у

1. колоструму код третиране групе (157 ± 34 g/L) а најнижа у 4. колоструму код контролне групе првотелки (10 ± 7 g/L).

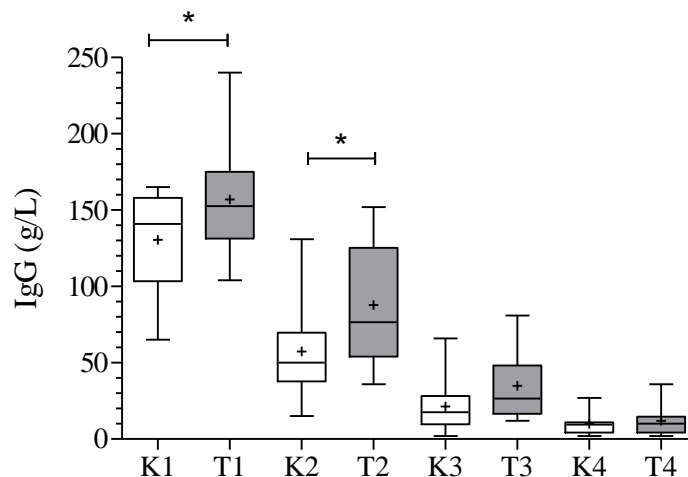
Табела 5.1.10. Концентрација IgG (g/L) у пуном колоструму првотелки контролне и групе третиране органски модификованим клиноптилолитом: RID метод.

	IgG (g/L)							
	Колоструми							
	1.		2.		3.		4.	
	К	Т	К	Т	К	Т	К	Т
\bar{x}	130	157	57	88	21	35	10	12
Me	141	153	50	77	18	27	10	10
SD	33	34	30	40	15	24	7	9
SE	8	8	7	9	4	5	2	2
Iv	65-165	104-240	15-131	36-152	2-66	12-81	2-27	2-36
Интеркв. разлика	104-158	131-175	38-70	54-125	10-28	17-48	4-11	4-15
C _v %	26	22	52	46	73	69	72	79

К- контролна група првотелки (n=16), Т- третирана група првотелки (n=20); \bar{x} - средња вредност; Me - медијана; SD - стандардна девијација; SE - стандардна грешка; Iv- интервал варијације; C_v - коефицијент варијације.

Статистичка значајност разлика средњих вредности/медијана концентрације IgG у колострумима између контролне и третиране групе животиња приказана је на слици 5.1.10. Анализом статистичке значајности утврђених разлика средњих вредности концентрације IgG у колострумима између контролне и третиране групе животиња, може се уочити да постоји статистичка значајност у 1. и 2. колоструму. У 1. колоструму код третиране групе првотелки средња вредност концентрације IgG (157 ± 34 g/L; Me=153 g/L) је била статистички значајно виша (за 21%; $p < 0,05$; т-тест) у односу на средњу вредност истог параметра одређеног у контролној групи (130 ± 33 g/L; Me=141 g/L). У 2. колоструму, такође код третиране групе животиња, утврђена је статистички значајно виша (за 54%; $p < 0,05$; Mann Whitney U-тест) средња вредност концентрације IgG (88 ± 40 g/L; Me=77 g/L) у односу на средњу

вредност истог параметра одређеног у контролној групи (57 ± 30 g/L; Me=50 g/L).



Слика 5.1.10. Утицај пероралног давања органски модификовног клиноптилолита на концентрацију IgG у колоструму првотелки.

На хистограмима су приказани: средња вредност (+); медијана, као линија унутар хистограма; вредност унутар правоугаоника приказује опсег од 25% до 75% вредности анализираних група, граници означавају распон од минималне до максималне вредности. (*) статистички значајна разлика третиране у односу на контролну групу, $p < 0,05$.

5.1.11. Запремина излученог колострума

Вредности запремине (L) излученог колострума ($\bar{x} \pm SD$, Me) током 1., 2., 3. и 4. узорковања код контролне и третиране групе првотелки као и основне статистичке мере варијације приказани су у табели 5.1.11. Подаци приказани у овој табели показују да је у 4. узорковању колострума код обе групе испитиваних животиња измерена иста највиша средња вредност количине излученог колострума (6 ± 2 L). Најнижа средња вредност количине излученог колострума, измерена је у контролној групи у 2. узорковању (3 ± 2 L).

Статистичком анализом разлика средњих вредности/медијана запремине излученог колострума сва 4 узорковања, нису установљене статистички значајне разлике између контролне и третиране групе животиња.

Табела 5.1.11. Укупна запремина колострума (L) првотелки контролне и групе третиране органски модификованим клиноптилолитом.

	Запремина колострума (L)							
	Колоструми							
	1.		2.		3.		4.	
	К	Т	К	Т	К	Т	К	Т
\bar{x}	4	5	3	4	5	6	6	6
Me	4	3	4	4	5	5	6	6
SD	2	3	2	2	2	2	2	2
SE	1	1	1	1	1	1	1	1
I _v	1-6	1-12	1-7	1-8	1-8	3-12	3-10	4-10
Интеркв. разлика	3-5	2-6	2-4	3-5	3-6	4-7	5-8	5-8
C _v %	41	64	50	43	44	43	34	27

К- контролна група првотелки (n=16), Т- третирана група првотелки (n=20); \bar{x} - средња вредност; Me - медијана; SD - стандардна девијација; SE - стандардна грешка; I_v- интервал варијације; C_v - коефицијент варијације.

5.1.12. Маса γ глобулина у колостралном серуму

Маса γ глобулина у колостралном серуму је израчуната множењем концентрације γ глобулина, одређене АЕП, и укупне запремине колострума. Вредности масе (g) γ глобулина ($\bar{x}\pm SD$, Me) у узорцима 1., 2., 3. и 4. колострума контролне и третиране групе првотелки као и основне статистичке мере варијације приказани су у табели 5.1.12. Подаци приказани у овој табели показују да је највиша средња вредност масе γ глобулина забележена у 1. колоструму код третиране групе првотелки (472±237 g). Најнижа средња вредност процента суве материје забележена је у 4. колоструму код контролне групе (55±38 g). Такође се уочавају велике варијације вредности масе γ глобулина унутар сваке групе и у сваком испитиваном термину групе и као последица овако велике варијабилности јављају се високе стандардне девијације код обе испитиване групе у свим узорцима колострума.

Табела 5.1.12. Маса γ глобулина (g) у колостралном серуму првотелки контролне и групе третиране органски модификованим клиноптилолитом.

	Маса γ глобулина (g)							
	Колоструми							
	1.		2.		3.		4.	
	К	Т	К	Т	К	Т	К	Т
\bar{x}	373	472	135	257	76	131	55	61
Me	346	465	133	204	71	97	49	50
SD	212	237	75	138	57	79	38	34
SE	55	59	20	33	15	20	10	8
I _v	81-	174-	29-	79-	9-	63-	13-	17-
	826	878	291	530	226	330	169	133
Интеркв. разлика	209-462	247-678	70-170	143-349	32-113	76-162	33-62	34-87
C _v %	57	50	55	54	75	60	70	56

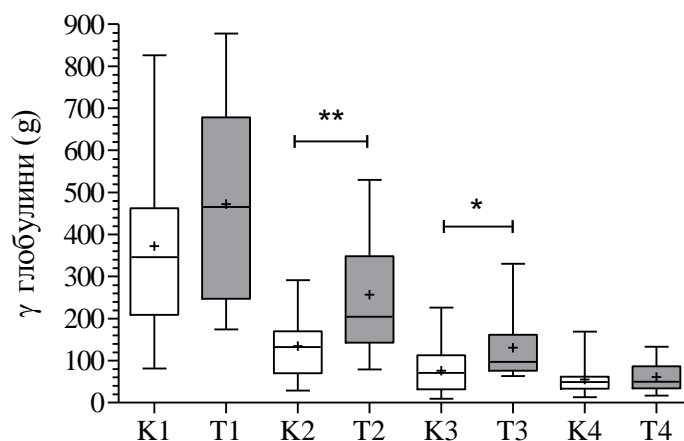
К- контролна група првотелки (n=16), Т- третирана група првотелки (n=20); \bar{x} - средња вредност; Me - медијана; SD - стандардна девијација; SE - стандардна грешка; I_v- интервал варијације; C_v - коефицијент варијације.

Статистичка значајност разлика средњих вредности/медијана масе γ глобулина у колостралним серумима између контролне и третиране групе животиња приказана је на слици 5.1.12.

Анализом статистичке значајности утврђених разлика средњих вредности масе γ глобулина у колостралним серумима између контролне и третиране групе животиња, на слици 5.1.12. може се уочити да постоји висока статистичка значајност у 2. и 3. колоструму. У 2. колоструму код третиране групе првотелки средња вредност масе γ глобулина (257±138 g; Me=204 g) је била статистички значајно виша (за 90%; p<0,01; т-тест) у односу на средњу вредност истог параметра одређеног у контролној групи (135±75 g; Me=133 g). У 3. колоструму, такође код третиране групе животиња, утврђена је статистички значајно виша (за 72%; p<0,05; Mann Whitney U-тест) средња вредност масе γ глобулина (131±79 g; Me=97 g) у односу на средњу вредност истог параметра одређеног у контролној групи (76±57 g; Me=61 g).

На слици 5.1.12. такође може се видети да је у осталим испитиваним узорцима колострума, 1. и 4., средња вредност масе γ глобулина код првотелки

третиране групе била виша у односу на контролну групу, али ова разлика није била статистички значајна.



Слика 5.1.12. Утицај пероралног давања органски модификовног клиноптилолита на масу у глобулина у колостралном серуму првотелки.

На хистограмима су приказани: средња вредност (+); медијана, као линија унутар хистограма; вредност унутар правоугаоника приказује опсег од 25% до 75% вредности анализираних групе, граничници означавају распон од минималне до максималне вредности. (**) и (*) статистички значајна разлика третиране у односу на контролну групу, $p < 0,01$ и $p < 0,05$.

5.1.13. Маса IgG у колоструму

Маса IgG у колоструму је израчуната множењем концентрације IgG одређене RID тестом и укупне заремине колострума. Вредности масе (g) IgG ($\bar{x} \pm SD$, Me) у узорцима 1., 2., 3. и 4. колострума контролне и третиране групе првотелки као и основне статистичке мере варијације приказани су у табели 5.1.13. Из анализираних узорка колострума подаци приказани у овој табели показују да је највиша средња вредност масе IgG забележена у 1. колоструму код третиране групе првотелки (662 ± 396 g). Најнижа средња вредност масе IgG забележена је у 4. колоструму код контролне групе (64 ± 45 g). Такође се могу запазити велике индивидуалне варијације у вредностима масе IgG у

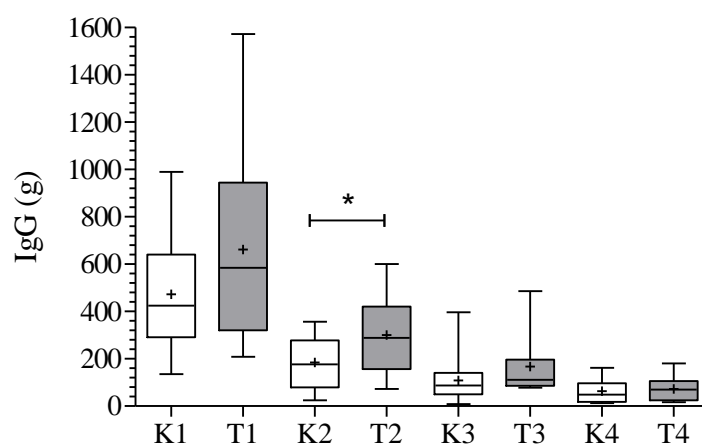
колоструму, и у складу са тим постоје и високе стандардне девијације код обе испитиване групе у свим узорцима колострума.

Табела 5.1.13. Маса IgG (g) у колоструту првотелки контролне и групе третиране органски модификованим клиноптилолитом.

	Маса IgG (g)							
	Колоструми							
	1.		2.		3.		4.	
	К	Т	К	Т	К	Т	К	Т
\bar{x}	473	662	184	301	109	167	64	72
Me	425	585	177	288	87	112	49	70
SD	257	396	109	156	98	120	45	49
SE	66	96	29	38	26	30	12	12
I _v	135- 990	208- 1572	25- 357	72- 600	9- 396	78- 486	12- 162	16- 180
Интеркв. разлика	291- 640	321- 945	80- 278	157- 421	50- 141	86- 197	19- 97	24- 106
C _v %	54	60	59	52	91	72	71	68

К- контролна група првотелки (n=16), Т- третирана група првотелки (n=20); \bar{x} - средња вредност; Me - медијана; SD - стандардна девијација; SE - стандардна грешка; I_v- интервал варијације; C_v - коефицијент варијације.

Статистичка значајност разлика средњих вредности/медијана масе IgG у колострумима између контролне и третиране групе животиња приказана је на слици 5.1.13. Анализом статистичке значајности утврђених разлика средњих вредности масе IgG у колострумима између контролне и третиране групе животиња (слика 5.1.13.), може се уочити да постоји статистичка значајност у 2. колоструму код третиране групе првотелки, при чему је средња вредност масе IgG (301±156 g; Me=288 g) била статистички значајно виша (за 63%; p<0,05; т-тест) у односу на средњу вредност истог параметра одређеног у контролној групи (184±109 g; Me=177 g). На слици 5.1.13. такође се може видети да је у осталим испитиваним узорцима колострума, 1., 2. и 4., средња вредност масе IgG код првотелки третиране групе била виша у односу на контролну групу, при чему та разлика, због великих индивидуалних варијација, није била статистички значајна.



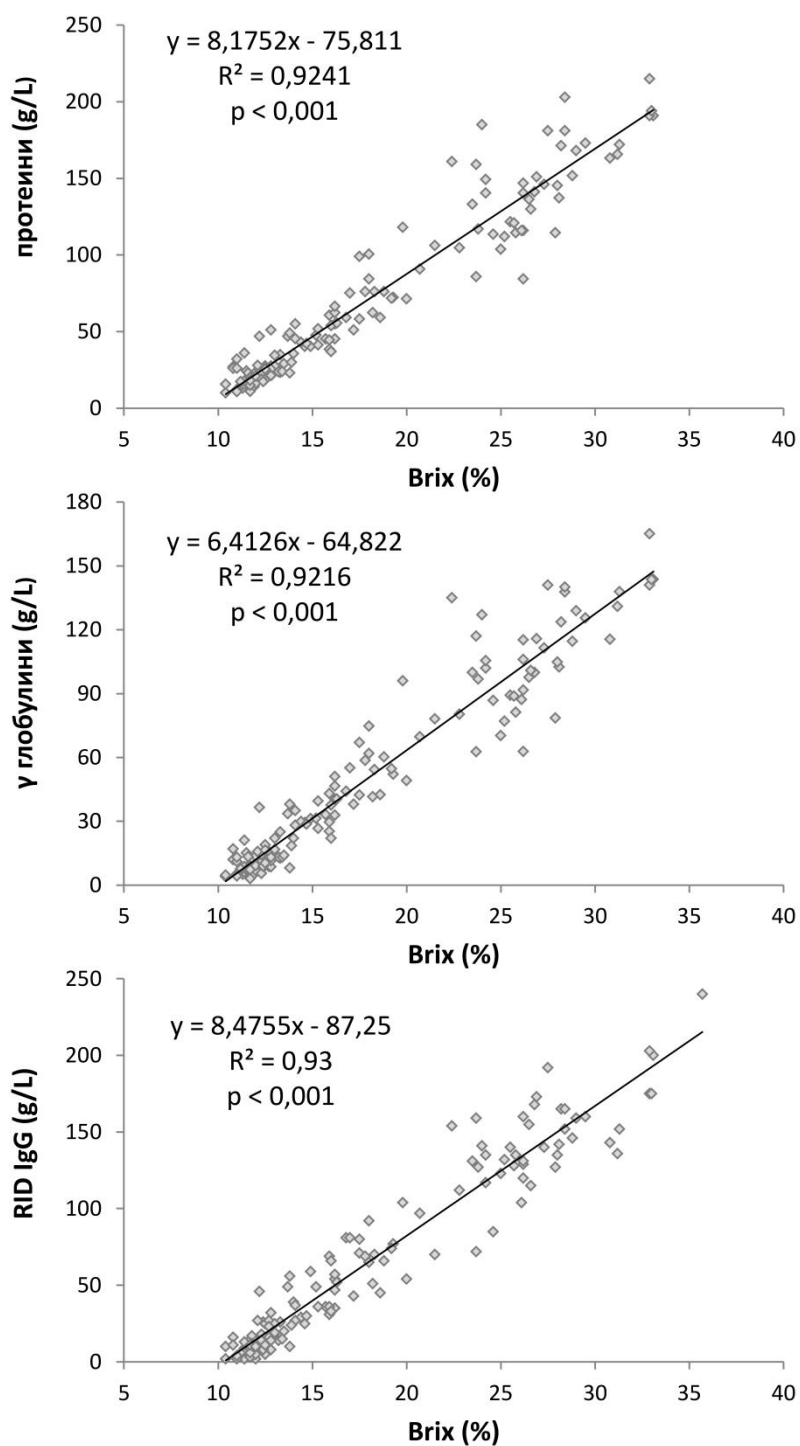
Слика 5.1.13. Утицај пероралног давања органски модификовног клиноптилолита на масу IgG у колоструму првотелки.

На хистограмима су приказани: средња вредност (+); медијана, као линија унутар хистограма; вредност унутар правоугаоника приказује опсег од 25% до 75% вредности анализираних група, граничници означавају распон од минималне до максималне вредности. (*) статистички значајна разлика третиране у односу на контролну групу, $p < 0,05$.

5.1.14. Дијагностичке карактеристике Brix рефрактометрије као методе за процену квалитета колострума

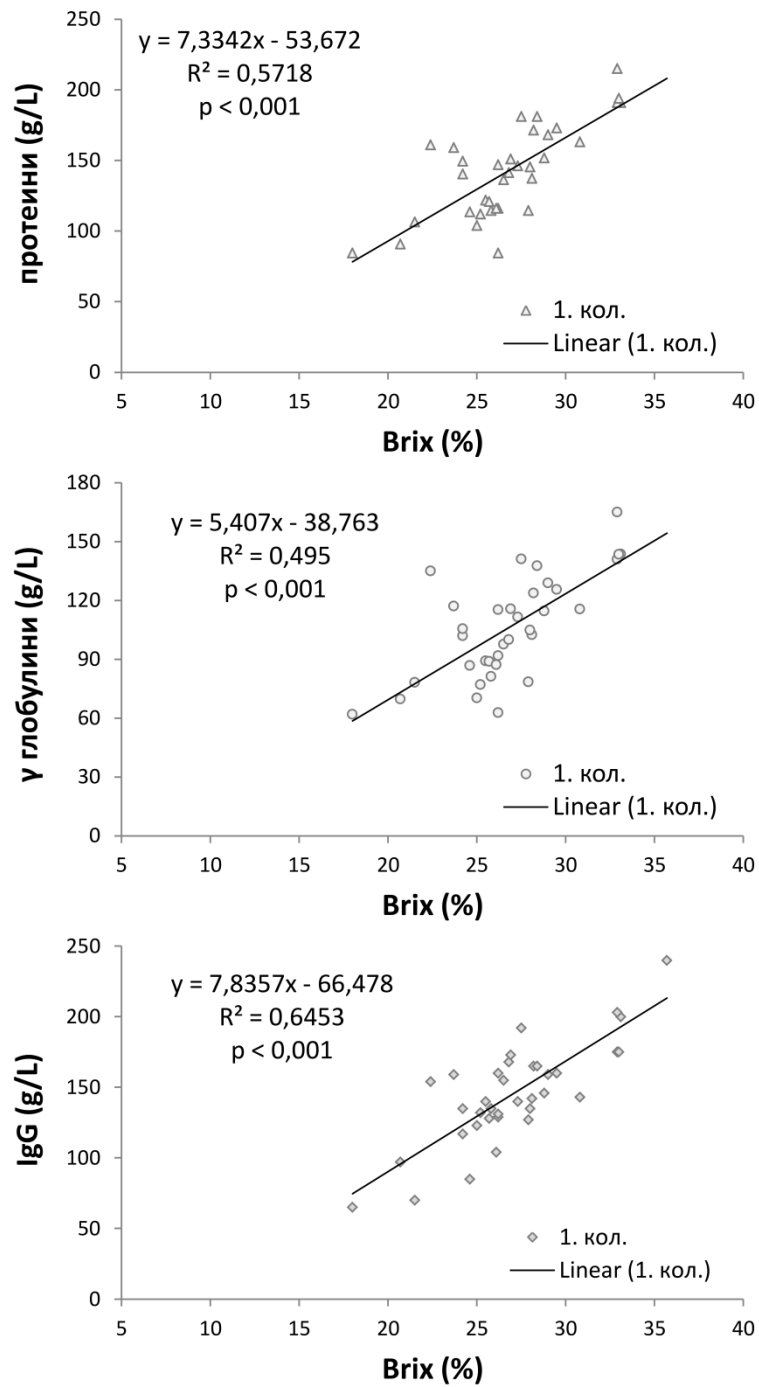
Да би се се потврдило да Brix рефрактометрија може са сигурношћу да се користи за процену квалитета колострума и на нашим фармама, у овом раду корелиране су вредности Brix (%) колострума и концентрације укупних протеина и γ глобулина који преобладају садрже IgG у колостралном серуму. Такође урађена је и корелација вредности Brix (%) колострума и концентрације колостралних IgG одређених RID методом која је златни стандард за процену квалитета колострума.

Резултати линеарне корелационе анализе приказани су на слици 5.1.14. Када су корелиране вредности свих колостралних серума и колострума испитиваних животиња, из све четири муже, показано је да је корелација вредности Brix (%) и концентрација укупних протеина и γ глобулина у колостралном серуму; затим, корелација вредности Brix (%) и концентрација колостралних IgG одређених радијалном имунодифузијом била позитивна и статистички високо значајна ($p < 0.001$). Линеарном регресионом анализом показано је да ова високо значајна корелација ($p < 0.001$) постоји и када се анализирају колоструми свих испитиваних животиња појединачно за 1. и 2. колострум. Резултати за 1. и 2. колострум су приказани на сликама 5.1.14.1. и 5.1.14.2.



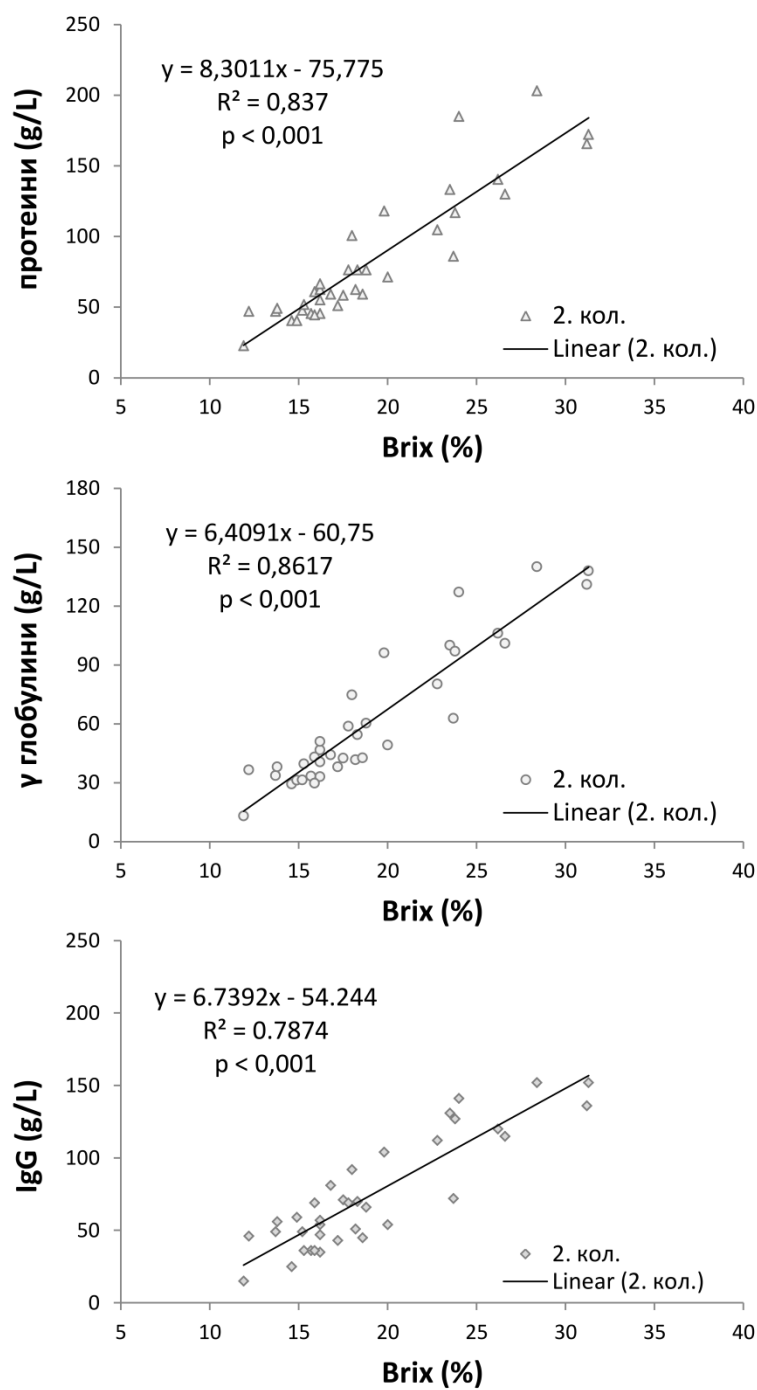
Слика 5.1.14. Колоструми из четири муже (1., 2., 3. и 4. колострум) првотелки контролне и третиране групе: корелација вредности Brix (%) и концентрације укупних протена (биуретска метода), γ глобулина колостралног серума (АЕП) и укупних колостралних IgG (RID);

(♦) – експериментални подаци; (—) –линеарна регресиона анализа.



Слика 5.1.14.1. Први колострум првотелки контролне и третиране групе: корелација вредности Brix (%) и концентрације укупних протена (биуретска метода), γ глобулина колостралног серума (АЕП) и укупних колостралних IgG (RID);

(\diamond)(\triangle)(\circ) – експериментални подаци; (—) –линеарна регресиона анализа.



Слика 5.1.14.2. Други колострум првотелки контролне и третиране групе: корелација вредности Brix (%) и концентрације укупних протена (биуретска метода), γ глобулина колостралног серума (АЕП) и укупних колостралних IgG (RID);

(\blacklozenge)(\blacktriangle)(\circ) – експериментални подаци; (—) –линеарна регресиона анализа.

Сензитивност и специфичност Brix методе за 1. и 2. колострум је израчуната на основу критеријума да су узорци са више од 50 g/L IgG позитивни, односно представљају колострум задовољавајућег квалитета (Bielmann и сар., 2010). Резултати приказани на табели показују да су утврђене највише вредности сензитивности и специфичности (90% и 92%) за вредност Brix-а од 18% и која се због тога може узети као гранична вредност која дефинише квалитетан колострум тј. са довољном концентрацијом IgG (табела 5.1.14.). С обзиром да су у нашем огледу најниже измерене концентрације IgG у првом колоструму биле изнад 50 g/L, сензитивност и специфичност Brix методе за 1. колострум је израчуната на основу критеријума да су узорци са више од 85g/L IgG позитивни, односно представљају колострум задовољавајућег квалитета. Резултати приказани на табели показују да су утврђене највише вредности сензитивности и специфичности (94% и 67%) за вредност Brix-а која је износила 24% и која се због тога може узети као гранична вредност која дефинише квалитетан колострум тј. колострум са довољном концентрацијом IgG (табела 5.1.14.1.).

Табела 5.1.14. Дијагностичке карактеристике Brix методе изведене на основу резултата мерења концентрације IgG у 1. и 2. колоструму RID методом, за граничну вредност од 50g/L IgG и 16%, 18% и 20% Brix.

Гранична вредност Brix (%)	1. и 2. колострум			
	Сензитивност (%)	Специфичност (%)	ППВ (%)	НПВ (%)
16	97	67	93	80
18	90	92	98	67
20	76	100	100	40

ППВ – позитивна предиктивна вредност; НПВ – негативна предиктивна вредност

Табела 5.1.14.1. Дијагностичке карактеристике Brix методе изведене на основу резултата мерења концентрације IgG у 1. колоструму RID методом, за граничну вредност од 85g/L IgG и 18%, 20, 22 и 24% Brix.

Гранична вредност Brix (%)	1. колострум			
	Сензитивност (%)	Специфичност (%)	ППВ (%)	НПВ (%)
18	100	33	94	100
20	100	33	94	100
22	97	50	94	50
24	94	67	97	50
26	76	100	100	42

ППВ – позитивна предиктивна вредност; НПВ – негативна предиктивна вредност

5.2. Утицај пероралног давања органски модификовног клиноптилолита на хомеостазу параметара периферне крви првотелки

Ефекат пероралног давања органски модификовног клиноптилолита на хомеостазу параметара периферне крви првотелки је процењен на основу резултата мерења основних биохемијских/метаболичких параметара периферне крви, анализе концентрације протеина главних електрофоретских фракција крвног серума (α , β , γ глобулини и албумини) и релативне заступљености γ глобулинских фракција крвног серума.

5.2.1. Утицај пероралног давања органски модификовног клиноптилолита на основне биохемијске/метаболичке параметре периферне крви испитиваних првотелки

У серумима третиране и контролне групе првотелки у интервалима 20 ± 5 дана пред тељење, 7 ± 3 дана пред тељење и 2. дана тељења, измерена је концентрација следећих биохемијских параметара: укупни протеини, албумини, глукоза, уреа, триглицериди, холестерол, бета-хидрокси бутират (ВНВ), калцијум, магнезијум и фосфор (табела 5.2.1а и 5.2.1б).

Анализом основних биохемијских параметара крви свих испитиваних првотелки у огледу, нису утврђене статистички значајне разлике између контролне и групе третиране органски модификованим клиноптилолитом.

5.2.2. Утицај пероралног давања органски модификованог клиноптилолита на концентрацију протеина главних електрофоретских фракција крвног серума првотелки

Концентрација протеина у протеинским фракцијама крвног серума првотелки раздвојних АЕП анализирана је у 5 термина: 20 ± 5 дана пред тељење, 7 ± 3 дана пред тељење, 1., 2. и 7. дана након тељења. У гелу агарозе протеини крвног серума првотелки су се раздвојили у четири главне електрофоретске фракције: албумине, α , β и γ глобулине. Резултати приказани у табели 5.2.2. су

показали да ни у једном испитиваном термину перорално давање органски модификованог клиноптилолита није изазвало значајно повећање концентрације албумина, α , β и γ глобулина у серумима третиране у односу на контролну групу првотелки.

Табела 5.2.1а. Вредности основних биохемијских/метаболичких параметара у периферној крви првотелки контролне и групе третиране органски модификованим клиноптилолитом.

	Укупни протеини g/L			Албумини g/L			Глукоза mmol/L			Уреа mmol/L			β хидрокси бутират mmol/L		
дани [#]	-20±5	-7±3	2	-20±5	-7±3	2	-20±5	-7±3	2	-20±5	-7±3	2	-20±5	-7±3	2
	К			К			К			К			К		
\bar{x}	66	65	69	33	33	34	2.9	3.4	3.1	2.6	2.6	4.1	0.5	0.6	0.6
Me	64	68	69	33	33	33	2.9	3.3	3.1	2.0	2.4	3.9	0.5	0.6	0.6
SD	6	6	5	3	2	3	0.3	0.6	0.8	0.9	1.1	1.4	0.2	0.2	0.2
SE	2	2	1	1	1	1	0.1	0.2	0.2	0.3	0.3	0.4	0.1	0.1	0.1
min	57	55	58	27	30	31	2.4	2.4	1.8	1.4	0.7	2.5	0.2	0.3	0.1
max	75	73	76	38	37	41	3.4	4.7	4.4	4.6	4.2	7.8	0.7	0.9	0.9
Cv (%)	9	9	7	9	7	9	12	17	26	37	41	35	32	30	35
	Т			Т			Т			Т			Т		
\bar{x}	67	65	66	33	32	32	2.8	3.3	3.2	2.1	3.0	3.3	0.4	0.5	0.6
Me	69	66	66	33	32	32	2.7	3.2	3.0	2.3	2.9	2.9	0.4	0.5	0.6
SD	4	5	5	2	2	2	0.3	0.5	0.7	0.8	1.0	0.9	0.1	0.1	0.1
SE	1	1	1	1	1	1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0
min	58	57	58	30	30	28	2.4	2.6	2.4	0.7	1.5	2.0	0.2	0.3	0.4
max	74	74	76	36	38	38	3.4	4.4	5.2	3.2	5.0	5.3	0.7	0.8	0.8
Cv (%)	6	7	8	5	5	8	10	16	23	31	26	22	31	26	22

-20±5: 20±5 дана пре тељења; -7±3: 7±3 дана пре тељења; 2: 2 дана после тељења.

К- контролна група првотелки (n=16), Т- третирана група првотелки (n=20); \bar{x} - средња вредност; Me – медијана; SD – стандардна девијација; SE – стандардна грешка; Cv – коефицијент варијације.

Табела 5.2.16. Вредности основних биохемијских/метаболичких параметара у периферној крви првотелки контролне и групе третиране органски модификованим клинотилолитом.

	Фосфор mmol/L			Калцијум mmol/L			Магнезијум mmol/L			Триглицериди mmol/L			Холестерол mmol/L		
дани [#]	-20±5	-7±3	2	-20±5	-7±3	2	-20±5	-7±3	2	-20±5	-7±3	2	-20±5	-7±3	2
	К			К			К			К			К		
\bar{x}	2.2	2.3	1.8	2.4	2.5	2.4	0.9	1.0	1.0	0.2	0.2	0.2	2.7	2.3	2.4
Me	2.2	2.2	1.9	2.5	2.4	2.5	1.0	1.0	1.1	0.1	0.1	0.1	2.6	2.2	2.3
SD	0.2	0.5	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.1	0.2	0.1	0.4	0.5	0.5
SE	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
min	1.6	1.4	1.5	1.7	2.3	2.1	0.6	0.6	0.7	0.1	0.1	0.1	2.2	1.6	1.8
max	2.6	3.3	2.1	2.7	2.9	2.7	1.2	1.5	1.3	0.3	0.8	0.6	3.6	3.5	3.7
Cv (%)	11	23	13	12	8	9	19	27	19	42	39	38	14	20	20
	Т			Т			Т			Т			Т		
\bar{x}	2.0	1.9	1.6	2.6	2.4	2.5	0.9	0.9	0.9	0.2	0.3	0.3	2.5	2.6	2.3
Me	2.1	1.9	1.6	2.7	2.3	2.5	0.8	0.8	0.8	0.2	0.2	0.1	2.6	2.5	2.4
SD	0.2	0.4	0.4	0.3	0.2	0.4	0.2	0.3	0.2	0.1	0.4	0.4	0.3	0.5	0.4
SE	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
min	1.6	1.1	1.0	2.0	2.2	2.1	0.5	0.4	0.7	0.1	0.1	0.1	1.8	1.9	1.7
max	2.3	2.6	2.9	2.9	2.7	3.2	1.2	1.3	1.3	0.3	1.6	1.7	3.0	3.7	3.0
Cv (%)	9	21	27	11	7	14	23	30	25	32	45	69	13	18	18

-20±5: 20±5 дана пре тељења; -7±3: 7±3 дана пре тељења; 2: 2 дана после тељења.

К- контролна група првотелки (n=16), Т- третирана група првотелки (n=20); \bar{x} - средња вредност; Me – медијана; SD – стандардна девијација; SE – стандардна грешка; CV – коефицијент варијације.

Табела 5.2.2. Концентрација протеина у главним електрофоретским фракцијама крвног серума првотелки.

Електрофоретска фракција		дани [#]									
		-20±5		-7±3		1		2		7	
		К	Т	К	Т	К	Т	К	Т	К	Т
γ глобулини (g/L)	\bar{x}	40	38	39	42	37	40	38	38	44	45
	Me	38	38	37	38	37	40	37	37	43	44
	SD	9	5	6	10	7	6	3	5	6	5
	SE	3	1	2	3	2	2	1	1	2	1
	min	30	27	30	33	28	31	33	31	34	36
	max	66	44	56	69	57	48	45	49	56	54
	Cv (%)	22	11	17	23	19	15	9	6	14	12
β глобулини (g/L)	\bar{x}	12	11	10	10	11	9	10	9	10	9
	Me	12	11	10	9	10	9	10	9	9	9
	SD	1	1	1	2	2	1	2	2	3	2
	SE	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
	min	9	9	9	8	8	7	8	7	6	7
	max	14	14	13	16	14	10	14	12	16	15
	Cv (%)	12	12	12	22	19	9	16	17	28	21
α глобулини (g/L)	\bar{x}	7	7	7	8	6	7	7	6	8	7
	Me	7	8	7	7	6	7	8	6	8	6
	SD	1	2	1	1	1	1	1	1	3	2
	SE	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
	min	5	5	6	6	5	5	5	4	3	4
	max	8	12	9	12	7	9	9	9	14	14
	Cv (%)	11	19	14	18	9	14	17	20	31	33
Албумини (g/L)	\bar{x}	28	27	27	29	28	27	28	31	28	24
	Me	27	27	26	26	28	27	30	27	28	25
	SD	3	3	3	7	2	2	2	4	4	2
	SE	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
	min	25	21	22	23	25	23	26	27	21	21
	max	34	33	34	49	30	29	31	43	33	28
	Cv (%)	10	8	12	23	5	6	6	13	14	10

-20±5: 20±5 дана пре тељења; -7±3: 7±3 дана пре тељења; 1, 2 и 7: 1, 2 и 7 дана после тељења.

К- контролна група првотелки (n=16), Т- третирана група првотелки (n=20); \bar{x} - средња вредност; Me – медијана; SD – стандардна девијација; SE – стандардна грешка; Cv – коефицијент варијације.

5.2.3. Утицај пероралног давања органски модификованог клиноптилолита на релативну заступљеност γ глобулинских фракција крвног серума првотелки

Након електрофоретског раздвајања протеина крвног серума у гелу агарозе, у γ зони се уочавају две делимично суперпониране протеинске фракције: фракција тзв. спорих или катјонских γ глобулина и фракција тзв. брзих, анјонских γ глобулина. Релативни удео ове две фракције, изражен као % од укупних γ глобулина, анализиран је 20 ± 5 дана пре тељења, 7 ± 3 дана пре тељења, 1., 2. и 7. дана након тељења. И код третиране и код контролне групе првотелки, 20 ± 5 дана пре тељења, релативна заступљеност ове две фракције γ глобулина је била готово идентична (табела 5.2.3.). У интервалу 7 ± 3 дана пре тељења до 7. дана после тељења у контролној групи првотелки и групи третираној органски модификованим клиноптилолитом детектовано је повећање удела фракције спорих (катјонских) и смањење фракције брзих (анјонских) γ глобулина.

Перорално давање органски модификованог клиноптилолита је довело до благе али стистички значајне промене релативне засупљености γ глобулинских фракција 7 ± 3 дана пре тељења и првог дана тељења (слика 5.2.3). Тако је 7 ± 3 дана пре тељења детектовано значајно смањење ($p<0,01$) од 7% у релативном садржају спорих γ глобулина и пораст од 17% у релативном садржају брзих γ глобулина код третиране у односу на контролну групу. Супротан ефекат је примећен 1. дана тељења када је показано да се у третираној групи, у односу на контролну групу значајно повећава (за 7%; $p<0,05$) релативни садржај спорих γ глобулина а смањује (за 10%; $p<0,05$) релативни садржај брзих γ глобулина.

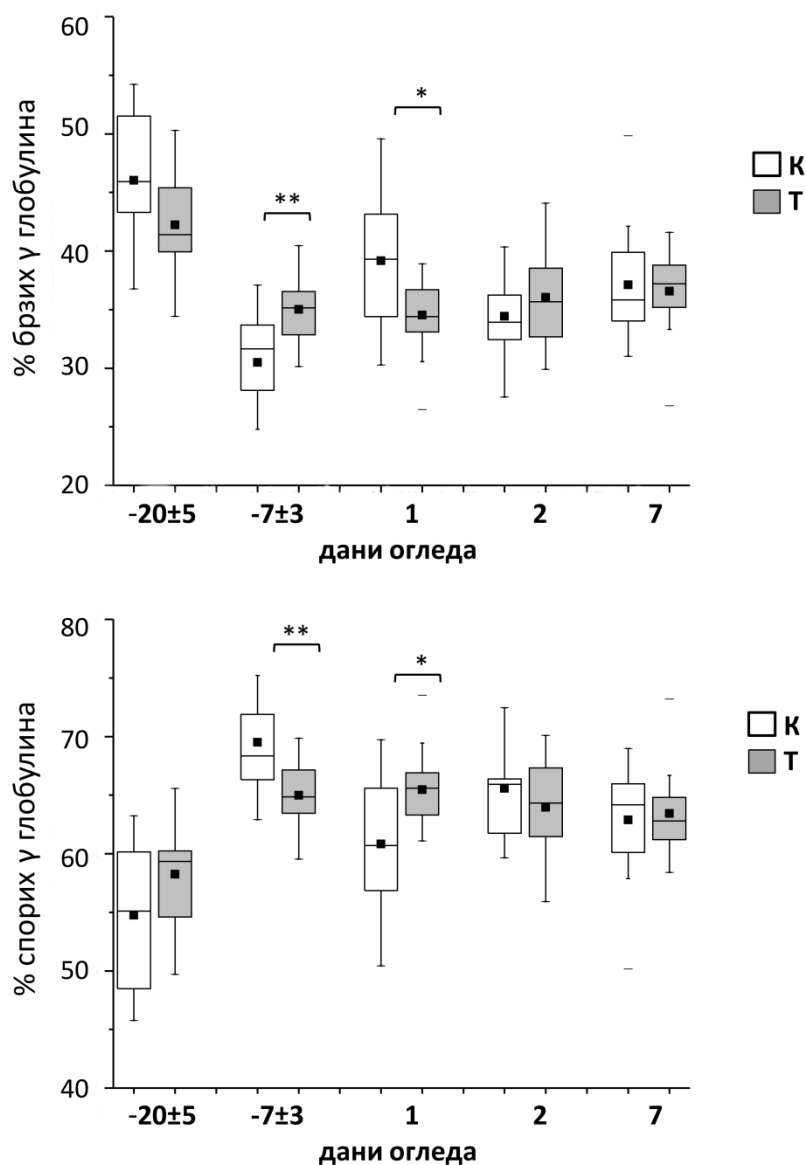
Табела 5.2.3. Утицај пероралног давања органски модификованог клиноптилолита на релативну заступљеност γ глобулинских фракција крвног серума првотелки.

		дани [#]									
		-20±5		-7±3		1		2		7	
		К	Т	К	Т	К	Т	К	Т	К	Т
Катјонски, спори γ глобулини (%)	\bar{x}	54	58	70	65	61	65	66	64	63	63
	Me	54	59	68	65	61	66	66	64	64	63
	SD	6	5	5	3	6	3	4	4	5	4
	SE	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1
	min	46	50	63	60	50	61	60	56	50	58
	max	63	66	80	70	70	74	72	70	69	73
	Cv (%)	11	8	7	4	9	5	5	7	8	13
Анјонски, брзи γ глобулини (%)	\bar{x}	46	42	30	35	39	35	34	36	37	37
	Me	46	41	32	35	39	34	34	36	36	37
	SD	6	5	5	3	6	3	4	4	5	4
	SE	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1
	min	37	34	20	30	30	26	28	30	31	27
	max	54	50	37	40	50	39	40	44	50	42
	Cv (%)	12	11	16	7	14	9	10	12	6	11

-20±5: 20±5 дана пре тељења; -7±3: 7±3 дана пре тељења; 1, 2 и 7: 1, 2 и 7 дана после тељења.

К- контролна група првотелки (n=16), Т- третирана група првотелки (n=20); \bar{x} - средња вредност; Me – медијана;

SD – стандардна девијација; SE – стандардна грешка; Cv – коефицијент варијације.



Слика 5.2.3. Утицај пероралног давања органски модификованог клиноптилолита на релативну заступљеност у глобулинских фракција крвног серума првотелки.

Дани огледа - 20±5: 20±5 дана пре тељења; -7±3: 7±3 дана пре тељења; 1, 2 и 7: 1, 2 и 7 дана после тељења. На хистограмима су приказани: средња вредност (•); медијана, као линија унутар хистограма; вредност унутар правоугаоника приказује опсег од 25% до 75% вредности анализираних група, граничници означавају највероватније вредности унутар скупа, (-) распон од минималне до максималне вредности. К- контролна група; Т- третирана група првотелки. (**) и (*) статистички значајна разлика третиране у односу на контролну групу, $p < 0,01$ и $p < 0,05$.

6. ДИСКУСИЈА

Истраживања у овој тези се односе на једно од важних и недовољно разјашњених питања побољшања квалитета колострума код првотелки. Вршена су испитивања утицаја пероралног давања органски модификованог клиноптилолита на концентрацију IgG који представља главни параметар процене квалитета колострума. Процена квалитета овог секрета испитиваних животиња, вршена је и анализом хемијског састава (вредност рН, проценат суве материје, масти и протеина) као и одређивањем вредности Brix-а. У колостралном серуму одређена је концентрација протеина и γ глобулина. Добијени резултати захтевају да се размотри неколико битних аспеката у вези синтезе колострума и процене његовог квалитета, посебно са методолошке тачке гледишта, као и да се размотре могући начини деловања органски модификованог клиноптилолита на састав и квалитет овог биолошки важног секрета.

Зеолит (својства и значај)

Зеолит се већ дуго времена користи као додатак у храни животиња, првенствено у циљу побољшања производних перформанси, свеобухватног здравственог стања и смањења морбидитета и морталитета код животиња. Такође се са великим успехом користи и као додатак храни ради спречавања штетног деловања микотоксина (Dvorak, 1989; Katsoulos и сар., 2016). Абсорптивни ефекат зеолита забележен је и према токсичним материјама као што су арсен, кадмијум и олово из течности румена и абомазуса код крава (Vrzgula и Seidel, 1989) а такође везује амонијак и продукте трулежних процеса (Bergero и сар., 1997). Истраживања су показала да клиноптилолит, као квантитативно и квалитативно најважнији састојак природног зеолита, има ефекат на побољшање прираста код телаци и смањену учесталост појаве дијареја (Zarcula и сар., 2010). Клиноптилолит утиче и на побољшање ресорпције одређених микро(олиго)елемената а посебно гвожђа и бакра (Vrzgula и сар., 1988).

У нашој земљи у Врањској бањи се налазе налазишта природног зеолита високог квалитета (са великим процентом клиноптилолита и до 90%). Бројни су препарати направљени од овог минерала за употребу у ветеринарској медицини. Радови аутора са Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду и других наших институција су показали да комерцијални препарат зеолита који садржи пречишћени клиноптилолит, даван *per os* теладима као додатак у колоструму, доводи до повећања концентрације IgG у крвном серуму код новорођене телад. Позитиван ефекат зеолита-клиноптилолита је довео до регистрације препарата Minazel S[®] који је нашао успешну примену у говедарској производњи за узгој младе телад (Stojić и сар., 1995, Fratrić и сар., 2005; 2007; Gvozdić и сар., 2007). Поред природних зеолита савременом технологијом добијена су и нова једињења као што су органски модификован клиноптилолит (Minazel Plus[®]). Минералну компоненту овог препарата површински модификованог зеолита чине клиноптилолит (минимално 85%) уз мали удео алуминосиликата (максимум 5%), кварца (максимум 5%) и других минерала глине (од 5-10%).

Дуготрајна истраживања значаја/добробити употребе клиноптилолита код подмладка млечних крава подстакла су нас на даља истраживања ефеката пероралног давања органски модификованог клиноптилолита код првотелки на њихове лактационе перформансе, а посебно на производњу квалитетног колострума, који је од непроцењивог значаја за узгој здраве телад. У прилог овом размишљању и хипотези подстакла су нас и истраживања неких аутора као што су Katsoulos и сар., (2005) који су показали да дуготрајна суплементација клиноптилолитом код млечних крава има позитивне ефекте на метаболизам и на здравље животиња. Dschaak и сар., (2010) су такође показали да примена зеолита има позитиван ефекат на млечност, као и на састав млека (пре свега протеина млека).

Колострум

За здравље и преживљавање новорођене телад од великог је значаја уношење адекватне количине колострума доброг квалитета, одмах после рођења. С обзиром на структуру плаценте код говеда телад се рађају без

имуноглобулина (физиолошка агамаглобулинемија) и зависе од пасивног трансфера матерналних имуноглобулина преко колострума. Колострум садржи врло високу концентрацију имуноглобулина (40-200 g/L). Највећи део (85-90%) имуноглобулина у колостралном серуму су молекули IgG класе. Концентрација IgG је стога примарни фактор од кога зависи пасивни трансфер и употребљава се као главни параметар за процену квалитета колострума, а према међународним стандардима колострум високог квалитета је онај који садржи више од 50g/L IgG (Godden, 2008).

На концентрацију IgG у колоструму утичу бројни фактори као што су: здравствени статус крава, раса, лактација, волумен колострума, време до прве muže, годишње доба, дужина периода засушења, вакцинација (Godden, 2008). Данас се сматра да су краве у првој и каснијим лактацијама даваоци квалитетног колострума, ако су здраве, вакцинисане, имају потребну дужину периода засушења и оптималан менаџмент транзиционог периода. Иако се дуго сматрало да колострум првотелки није погодан за исхрану телади, данашње гледиште је да би колострум првотелки требало третирати као колострум крава и да се може користити у исхрани телади када задовољава критеријуме квалитета. Старије краве обично имају велики диверзитет антитела у колоструму због нормалног, годинама условљеног, сазревања имунског репертоара који настаје као резултат (првих и поновљених) контаката са много већим бројем различитих антигена. Међутим, у задњих десет година показано је да првотелке такође могу да производе квалитетан колострум (Kehoe и сар., 2011). Варијације у садржају IgG у колоструму код млечних крава указују на потребу за унапређењем контроле квалитета колострума и подешавања режима исхране телади колострумом у циљу обезбеђивања адекватног трансфера пасивног имунитета.

Досадашња истраживања употребе минералног адсорбента на бази клиноптилолита додатог у храну крава базирана су на утицају побољшања производних и репродуктивних перформанси као и превенцији метаболичких поремећаја и у основи побољшања општег здравственог стања. Међутим, степен учинка побољшања перформанси може зависити од врсте препарата коришћеног зеолита, физичкохемијских особина, његове чистоће у погледу

садржаја клиоптилолита, као и нивоа суплементације (Papaioannou и сар., 2005). Последњих година се све више у литератури помиње могућност примене различитих препарата модификованог зеолита. Сумирањем ефеката зеолита односно механизма и начина деловања, циљ нашег истраживања био је усмерен на испитивање утицаја органски модификованог клиноптилолита на квалитет колострума првотелки и укупно здравље првотелки процењено на основу резултата анализе главних биохемијских параметара периферне крви.

Одређивање процента суве материје, протеина и концентрације IgG у пуном колоструму

Резултати нашег истраживања су показали да су највише средње вредности процента суве материје, протеина и концентрације IgG забележене у 1. колоструму код обе групе испитиваних животиња и да временом њихова концентрација опада. Ови резултати су у сагласности са резултатима и других аутора (Foley и Otterby, 1978; Moore и сар., 2005; Godden, 2008). Просечне вредности концентрације IgG у 1. излученом колоструму код обе групе испитиваних животиња биле су знатно изнад 50g/L што се узима као гранична вредност која раздваја колострум доброг од колострума лошег квалитета. Кеное и сар., (2011) су дошли до истог закључка након одређивања концентрације IgG у колоструму крава у првој лактацији. У нашим истраживањима запажено је да третирање првотелки органски модификованим клиоптилолитом доводи до статистички значајног повећања процента протеина и концентрације IgG у 1. и 2. колоструму у односу на контролну групу. Просечне вредности процента суве материје у колоструму код третиране групе првотелки биле су више у поређењу са контролном групом као и када су упоређене са вредностима које су описали Мечог и сар., (1992). У нашим резултатима запажено је да третирање првотелки органски модификованим клиноптилолитом доводи до статистички значајног повећања процента суве материје у 2. колоструму код третиране у односу на контролну групу. Узимајући податак из литературе да се знатно већи проценат суве материје у колоструму у односу на млеко, приписује првенствено већем садржају протеина, односно имуноглобулина (Davis и Drackley, 1998), могло би се

очекивати да ће и проценат суве материје у колоструму третиране групе у односу на контролну бити статистички значајно виши и у 1. колоструму, што нашим резултатима није показано. Међутим, одузимањем масти од суве материје, параметар означен као проценат суве материје без масти, резултати наших истраживања показују да је просечна вредност овог параметра била статистички значајно виша код третиране групе у односу на контролну групу животиња и у 1. и у 2. колоструму, као и просечна вредност процента протеина и концентрације IgG.

Према нашим сазнањима, у научној литератури не постоје подаци о испитавању утицаја суплементације крава препаратом зеолита (клиноптилолита) на концентрацију IgG у колоструму. Повећање процента протеина и концентрације IgG у колоструму код третиране групе првотелки у нашем огледу, може се објаснити могућим утицајем органски модификованог клиноптилолита на повећање расположивости азота у бурагу а тиме и повољним утицајем на процес микробијалне синтезе протеина у преджелуцима код крава. Као што је познато, већина протеина и непротеинског азота се након уласка у румен разграђује до амонијака који је неопходан извор азота за синтезу бактеријских протеина (Dschaak, 2012). Само мали део протеина хране који не подлеже разградњи од стране бактерија бурага (енглески: Rumen undegradible proteins; RUP) доспева непромењен у танко црево где се разграђују до аминокиселина и преносе у циркулацију (Kirovski и сар., 2012). Микробијални протеини су протеини високог квалитета за животиње, варе се у танком цреву и имају добар баланс есенцијалних аминокиселина (Dschaak, 2012). С обзиром на то да се аминокиселине крви користе за синтезу протеина млека, смањење њихове концентрације доводи до смањене синтезе протеина у млечној жлезди и последично мање концентрације протеина у млеку или колоструму (Kirovski и сар., 2012). Повољан утицај природних зеолита на процес микробијалне синтезе протеина у преджелуцима код крава утврдили су и други аутори (Galindo и сар., 1986; Nikkha и сар., 2007). Аутори су у својим истраживањима проучавали утицај суплементације зеолита на популацију микроорганизама у бурагу и утврдили су да је дошло до значајног повећања целулолитичке популације бактерија.

Раст микробијалне популације у великој мери зависи од доступности азота и угљених хидрата у бурагу. Азот из амонијака се најефикасније инкорпорира у микробијалне протеине када је храна богата лако сварљивим угљеним хидратима, посебно скробом. Због тога што се протеолиза у румену одвија брзо, обично се превазилази ниво искоришћавања амонијака од стране микроорганизама и долази до његовог накупљања. Извесна количина амонијака се ресорбује преко зида румена, конвертује се у јетри у уреу, ослобађа се као тзв. азот пореклом из урее у крви (енглески: *blood urea nitrogen; BUN*) и екскретује у урин или рециклира назад до румена преко плувачке или дифузијом преко зида бурага. Ова неефикасност рециклирања азота енергетски кошта животињу (Dschaak, 2012). White и Ohlroggi (1974) су утврдили да зеолити могу да везују до 15% амонијумових јона, а затим их лагано отпуштају у садржај бурага и тиме закључили да клиноптилолит због тога може утицати на расположивост азота и последично на метаболизам протеина. Pond (1982) је такође утврдио да зеолит додат у храну испољава велику способност везивања амонијака у преджелуцима говеда, чиме спречава његово накупљање до токсичног нивоа у самом садржају, што се често догађа код исхране говеда храном са високим садржајем протеина. Сличан ефекат постоји и када се у храну додају превелике количине урее као извора непротеинског азота (Bosi и сар., 2002). Nestorov (1984) је доказао да истовремена примена клиноптилолита и урее у исхрани код оваца, штити флору бурага од токсичних ефеката амонијака доводећи до инхибиције смањења популације микроорганизама. Везивањем амонијака минерални адсорбер поприма својство резервоара амонијум јона, које по потреби отпушта лагано и постепено, што је од велике користи за неометано одвијање процеса микробијалне синтезе протеина у преджелуцима. Као што смо већ напоменули, ови структурни протеини бактерија, гљивица и инфузорија биће сварени у следећим одељцима дигестивног тракта, и ослобођени до крајњих продуката варења а то су аминокиселине, које се ту ресорбују и путем крви упућују на даље искоришћавање.

Битан резултат добијен у овој студији је да је 100% првог и 77% узорак другог колострума првотелки третираних органски модификованим

клиноптилолитом задовољило стандарде квалитета, односно да су имали више од 50 g/L IgG у колоструму. Код контролне групе првотелки 100% узорака првог и 50% узорака другог колострума је задовољило стандарде квалитета. Поред значаја ових резултата као несумњивог показатеља квалитета колострума свих првотелки гајених на фарми која је учествовала у овој студији, повећање процента другог колострума са више од 50 g/L IgG, који је у третираној групи износио 77% а у контролној групи 50%, додатно потврђује повољан утицај примењеног третмана на квалитет колострума првотелки (као и могућност продужене употребе квалитетног колострума).

Разлике у вредностима концентрације IgG у колоструму добијене у различитим студијама се могу објаснити и временским интервалом од тељења до сакупљања колострума који утиче на концентрацију IgG. Колострум сакупљан од крава у току првих 12 часова од тељења има 6 пута веће изгледе да буде доброг квалитета у односу на колострум крава који је сакупљан у каснијем периоду (Phipps и сар., 2017). Осим тога старије краве, затим краве отељене у рано пролеће и јесен производе колострум са већом концентрацијом IgG (Conneely и сар., 2013). Све ово указује на потребу, да се за потврду ових ефеката на квалитет колострума, ураде обимне и добро контролисане мултицентричне студије у којима би учествовале фарме које се налазе у регионима са којима деле сличне климатске, географске, еколошке али и економске одлике.

Масти

Код преживара, масти колострума потичу превасходно из нижих масних киселина ресорбованих у бурагу али и делом из масних киселина из крвотока. Од масних киселина бурага посебан значај у синтези масти млека има сирћетна киселина, која претежно настаје дигестијом сирових влакана из оброка, али делом и бутерна киселина која се у зиду бурага преводи у бета хидрокси бутерну/бутиринску киселину, која се користи за синтезу млечне масти. Масне киселине присутне у крвотоку које се користе за синтезу масти у млечној жлезди, настају од цуркулишућих липопротеина и неестерификованих масних киселина које потичу делом од апсорбованих липида из дигестивног тракта, и

делом из масти мобилисаних из телесних депоа (McGrath и сар., 2016; Bauman и Griinari, 2003). Одређене промене у метаболизму крава могу довести до пораста или смањења концентрације масти у колоструму. Неадекватна исхрана крава у перипарталном периоду може често имати за последицу снижену концентрацију масти у колоструму (Kehoe и сар., 2007; Morrill и сар., 2012a). Претерана употреба концентрованих хранива уз истовремени додатак кабасте хране последично може довести до ацидозе бурага што ће резултирати смањеним садржајем ацетата у бурагу а тиме и недовољном синтезом масти колострума. Sutton и сар. (1988) сматрају да се до 80% насталих варијација у погледу концентрације масти могу приписати променама у пропорционалном односу нижих масних киселина које настају у бурагу. Резултати наших испитивања су показали да је највиша средња вредност процента масти забележена у првом колоструму код обе групе испитиваних животиња чије су вредности у складу са литературним подацима (Foley и Otterby, 1978; Mechog и сар., 1992; Godden, 2008). Код третиране групе првотелки у 2. и 3. колоструму забележене су статистички значајно веће вредности процента масти у односу на контролну групу. С обзиром да код преживара масти колострума потичу преваходно из нижих масних киселина ресорбованих у бурагу, ови резултати се могу довести у везу са литертурним податком Karatzia и сар., (2011) где је код крава које су добијале препарат зеолита забележено повећање удела концентрације ацетата у бурагу. Sweeney и сар., (1984) су нашли да код крава холштајн-фризијске расе које су добијале 5% зеолита-клиноптилолита као додатак у храни, долази до смањења пропионата и повећања ацетата, односно повећања односа ацетат-пропионат. Grabherr и сар., (2009) су такође показали да је код крава које су биле суплементирание зеолитом (синтетски зеолит А) дошло до пораста процента ацетата у бурагу и смањења процента пропионата у односу на контролну групу, с тим да концентрација укупних масних киселина није била промењена. У истраживањима Hornig и сар., (1999) и Lopez и сар., (1988) такође је утврђено повећање масти у млеку код групе крава са додатком 2% зеолита у храну током 13 недеља. Насупротим овим резултатима Bosi и сар., (2002) у својим истраживањима наводе да суплементација крава зеолитом није имала утицај на концентрацију и моларни однос нижих масних киселина

као и на повећање млечне масти. Ефекат суплементације зеолитом-клиноптилолитом на састав нижих масних киселина у бурагу се разликује међу студијама. У истраживању Bosi и сар., (2002), процентуални удео клиноптилолита коришћеног препарата зеолита износио је 45%, што је знатно ниже од препарата коришћеног у нашој студији чији је проценат био 85%. Ове разлике у саставу примењеног зеолита у студијама, би могле објаснити разлике у ефекту суплементације зеолитом-клиноптилолитом на састав нижих масних киселина у бурагу.

Вредност рН

Вредност рН колострума је нешто нижа од вредности рН млека (McCarthy и Singh, 2009). Наши резултати показују да се вредност рН колострума постепено повећава са повећањем броја сати од тељења што је у сагласности са подацима које су описали McGrath и сар., (2016). Прецизан разлог за ниже вредности рН колострума у односу на млеко није довољно познат. Аутори овај податак доводе у везу са концентрацијом протеина која је у колоструму знатно већа него у млеку (Conte и Scarantino, 2013). Испитивањем пуферског капацитета, запажено је да колострум има већи пуферски капацитет у односу на млеко, што се приписује већем садржају протеина. У нашем истраживању утврђена је статистички значајна разлика између третиране и контролне групе у 1. колоструму, при чему је код третиране групе, претпостављамо због већег садржаја протеина, просечна вредност рН била статистички значајно нижа.

Валидација Brix рефрактометрије као методе за процену квалитета колострума

Обезбеђивање колострума доброг квалитета (концентрација IgG већа од 50g/L) је први корак у успостављању адекватног пасивног трансфера имунитета код новорођене телад. За процену квалитета колострума базираног на концентрацији IgG, у стадима млечних крава у скорије време са успехом се користи дигитални Brix рефрактометар (Chigerwe и сар., 2008; Biemann и сар., 2010; Morrill и сар., 2012b). Ова метода има предности у односу на друге

методе за процену концентрације IgG јер дигитални Brix рефрактометар није скуп, метода је брза и захтева минималну опрему и обученост, са њим се лако рукује, мање је фрагилан и мање сензитиван на варијације у температури колострума (Bielmann и сар., 2008). Brix рефрактометар омогућава брзу процену квалитета колострума на фарми што је значајно са аспекта исхране телади квалитетним колострумом како би се избегао неадекватан трансфер пасивног имунитета. У ранијим студијама је већ показано да се Brix рефрактометар може користити за процену концентрације IgG у колоструму код оваца (Harker, 1978) и кобила (Chavatte и сар., 1998; Cash, 1999).

С обзиром да се на нашим фармама рутинске процене квалитета колострума недовољно примењују, а због несумњиво великог значаја давања квалитетног колострума теладима због успостављања адекватног трансфера пасивног имунитета (серумски IgG већи од 10g/L), ми смо се одлучили да у својим истраживањима користимо и дигитални Brix рефрактометар са циљем да испитамо његову тачност-прецизност за употребу у процени квалитета колострума. Brix рефрактометар није до сада коришћен у нашој земљи и ово је прва студија у којој се процењује валидност ове методе за мерење концентрације колостралног IgG у фармским условима. Валидација је вршена поређењем резултата Brix рефрактометрије са концентрацијом колостралних IgG одређених RID методом који представља референтни метод за одређивање концентрације IgG колострума (Chigerwe и Hagey, 2014).

Ми смо већ у нашим ранијим истраживањима указали на велику потребу за једноставном и ефикасном методом као обавезном мером у контроли квалитета колострума (Stojić и сар., 2017). Наша истраживања су вршена код првотелки али се ова метода свакако може користити код свих крава без обзира на број лактације. Посебан изазов је био да се валидација врши управо код првотелки чији се колострум до сада сматрао мање вредним у односу на колострум старијих крава.

Резултати приказани у овој докторској дисертацији су показали да је средња вредност процента Brix-а у првом, другом и трећем излученом колоструму код третиране групе првотелки била статистички значајно виша у односу на средњу вредност процента Brix-а одређену у одговарајућим

колострумима контролне групе. Процент Brix-а добијен дигиталним Brix рефрактометром у првом колоструму код третиране групе првотелки кретао се у распону 23,7%-35,7% а код контролне групе 18,0%-30,8%. У првом колоструму, средња вредност процента Brix-а код третиране групе првотелки била је $28,2\% \pm 3,5$ а код контролне групе животиња $25,5\% \pm 3,4$. Добијене вредности код контролне групе у складу су са налазима Biemann и сар., (2010) док су вредности добијене код третиране групе биле веће. Quigley и сар., (2013) су утврдили да је просечан %Brix-а за први колострум износио $23,8\% \pm 3,5$ што је такође било знатно мање од наших нађених вредности код третиране групе животиња.

Гранична вредност %Brix-а која одваја колострум доброг од колострума лошег квалитета одређује се поређењем %Brix-а са концентрацијом IgG која је мерена неком стандардном лабораторијском методом. Лабораторијска метода која се користи као „златни стандард“ за процену концентрације IgG у колоструму је радијална имунодифузија (RID) и ми смо је користили за валидацију резултата квалитета колострума који се читавају дигиталним Brix рефрактометром. Ниво колостралног IgG од 50 g/L одређен RID методом, користи се као гранична вредност за раздвајање колострума доброг од колострума лошег квалитета. Као одговарајућа гранична вредност за %Brix-а узима се вредност са највећом сензитивношћу и специфичношћу (Chigerwe и сар., 2008; Biemann и сар., 2010) при одређеној концентрацији IgG утврђеној RID методом (Bartier и сар., 2015).

С обзиром да је у првом колоструму свих првотелки које су биле укључене у наше истраживање најнижа концентрација IgG била изнад граничне вредности од 50g/L IgG ми смо као граничну вредност узели вредност од 85 g/L IgG. У нашим истраживањима утврдили смо да је гранична вредност %Brix-а која дефинише квалитетан први колострум износила 24% за концентрацију IgG од 85 g/L. При овој граничној вредности %Brix-а сензитивност је износила 94%, специфичност 67%, позитивна предиктивна вредност 97% и негативна предиктивна вредност 50%. Смањивањем граничне вредности %Brix-а повећавала се сензитивност, али се смањивала специфичност. Слично нашим резултатима, Bartier и сар., (2015) су утврдили

да се за процену квалитетног првог колострума могу користити граничне вредности %Brix-а од 23% (највећа сензитивност и специфичност), с тим што су ту процену вршили на нивоу концентрације IgG од 50g/L. Dinsmore и Skidmore (2008) су такође показали да је одговарајућа гранична вредност за %Brix-а код првотелки износила 23%.

Резултати из литературе показују велика варирања у вредностима граничне вредности %Brix-а која дефинише квалитетан колострум. За први колострум са концентрацијом IgG већом од 50 g/L, проценат Brix-а се креће у опсегу од 18% Brix-а (Morrill и сар., 2012b) до 22% Brix-а (Bielmann и сар., 2010; Lokke и сар., 2016). Buczinski и Vandeweerd (2016) су слично нама показали да се за процену квалитетног првог колострума могу користити граничне вредности %Brix-а од 22% и више, с тим што су ту процену вршили на нивоу концентрације IgG од 50g/L. Такође су показали да се смањивањем граничне вредности %Brix-а повећавала сензитивност а смањивала специфичност. Silva-Del-Río и сар., (2017) су утврдили да је %Brix-а износио 20,9% за први колострум код *Jersey* расе крава. Morrill и сар., (2015) су у истраживањима такође код *Jersey* расе крава, показали да за први колострум граничне вредности од 18% и 19% Brix-а имају највећу сензитивност и специфичност и да при граничној вредности од 18% Brix-а, 94.83% узорака је тачно класификовано на основу концентрације IgG.

У литератури нема много података који се односе на процену квалитета другог колострума, с посебним нагласком на одсуство тих података код првотелки. Овакво стање у истраживањима је донекле нејасно имајући у виду да је процена и другог колострума важна за продужено снабдевање телади колострумом. Наши резултати су показали да су највише вредности сензитивности и специфичности Brix методе за 1. и 2 колострум првотелки (израчунате на основу критеријума да узорци са више од 50 g/L IgG представљају квалитетан колострум) износиле 90% и 92% за вредност Brix-а која је 18%. Слично нашим резултатима добијеним код холштајн расе крава, Silva-Del-Río и сар., (2017) су код *Jersey* расе крава утврдили да је гранична вредност % Brix-а за други колострум износила 19%.

Такође, у нашим истраживањима показали смо да вредности које су добијене Brix-ом високо корелирају са концентрацијом IgG одређеном RID методом (златним стандардом). Ови резултати су у складу са резултатима и других аутора (Bielmann и сар., 2010; Quigley и сар., 2013; Elsohaby и сар., 2017; Stojić и сар., 2017).

Концентрација γ глобулина у колостралном серуму

Просечне вредности концентрације γ глобулина 1. излученом колоструму код обе групе испитиваних животиња биле су знатно изнад граничне вредности од 50g/L, тј. вредности која раздваја колострум доброг од колострума лошег квалитета. Овакви наши резултати су у сагласности са резултатима које су недавно објавили Reschke и сар., (2017). Просечне вредности концентрације γ глобулина у свим испитиваним узорцима колостралног серума биле су веће код третиране у односу на контролну групу првотелки, а статистички значајне разлике забележене су у 2. и 3. колоструму. Одређивањем вредности укупних протеина у колостралном серуму биуретском методом, наши резултати показују да су у свим испитиваним узорцима просечне вредности биле веће код третиране у односу на контролну групу првотелки, а статистички значајне разлике забележене су такође у 2. и 3. колоструму. У нашим истраживањима показали смо да постоји статистички значајна корелација између концентрације укупних протеина одређених биуретском методом и γ глобулина у колостралном серуму одређене гел електрофорезом (Stojić и сар., 2017). До истих резултата корелације ових параметара у колостралном серуму код коза дошли су и Chen и сар., (1999) и Quiles и сар.,(1991). Ове значајне корелације су резултат чињенице да су имуноглобулини G класе доминантни имуноглобулини у колоструму. Поред тога утврдили смо да постоји значајна корелација између %Brix-а и концентрације γ глобулина у колостралном серуму одређене гел електрофорезом, и концентрације укупних протеина у колостралном серуму (Stojić и сар., 2017) што све указује да се Brix рефрактометрија може са сигурношћу користити за процену квалитета колострума на нашим фармама.

Маса γ глобулина и маса IgG

Укупна маса γ глобулина (g) и укупна маса IgG (g) израчунате су множењем концентрација γ глобулина и IgG са укупном количином, односно укупном запремином излученог колострума. Вредности укупне масе IgG код контролне групе првотелки добијене у нашим истраживању биле су у складу са резултатима Kehoe и сар., (2011), док су вредности добијене код третиране групе биле веће. У нашим резултатима може се видети да је просечна вредност укупне масе γ глобулина и масе IgG била већа код третиране у односу на контролну групу у свим испитиваним узорцима колострума. Статистички значајне разлике у маси γ глобулина пронађене су у 2. и 3. узорку колостралног серума, при чему су ове вредности биле веће код третиране у односу на контролну групу. Статистички значајна разлика у маси IgG пронађена је у 2. колоструму, при чему је ова вредност била већа код третиране у односу на контролну групу. С обзиром да статистички значајне разлике у количини излученог колострума колострума између третиране и контролне групе нису пронађене, ове значајне разлике у маси γ глобулина и маси IgG могу се приписати њиховој већој концентрацији у колоструму која је претходно описана.

Анализе крвног серума

У крвним серумима третиране групе и контролне групе првотелки одређена је концентрација следећих биохемијских параметара: укупни протеини, албумини, глукоза, уреа, триглицериди, холестерол, бета-хидроксипутират, калцијум, магнезијум и фосфор. Резултати наших истраживања показују да анализом ових биохемијских параметара крви код свих испитиваних првотелки, у интервалима 20 ± 5 дана пред тељење, 7 ± 3 дана пред тељење и 2. дана тељења нису утврђене статистички значајне разлике између контролне и групе третиране органски модификованим клиноптилолитом. На основу оваквих резултата, могли смо да закључимо да перорална примена органски модификованог клиноптилолита није имала негативан ефекат на укупне протеине, енергетски статус, и метаболизам липида и минерала у перипарталном периоду. Опсервацијом животиња које су биле укључене у

оглед нису запажени негативни утицаји пероралног давања органски модификованог клиноптилолита на укупно здравље и метаболизам третиране групе првотелки. Статистички значајне разлике у концентрацијама протеинских фракција крвног серума одређеним гел електрофорезом између третиране и контролне групе животиња такође нису забележене. Овај налаз је битан јер показује да повећана концентрација IgG у колоструму код третиране групе првотелки није била резултат смањене концентрације IgG у крвном серуму, што значи да животиње нису биле имунски угрожене и да није дошло до поремећаја хомеостазе на рачун промене у концентрацији било које фракције протеина крвног серума.

Иако није дошло до промене концентрације укупних γ глобулина у серумима третиране у односу на контролну групу првотелки, позитиван ефекат суплементације на ову класу протеина серума је показан кроз благе али статистички значајне промене у релативној заступљености фракција γ глобулина. Релативни садржај фракције брзих, анјонских γ глобулина који у себи преобладају садрже IgG1 (Kickofen и сар., 1968) је код третираних у односу на контролну групу био повишен 7 ± 3 дана пре тељења и смањен првог дана тељења. Овај резултат одражава њихову повећану синтезу у препарталном периоду и повећан транспорт у колострум на дан тељења и било је у складу са резултатима ове дисертације који су показали да суплементација органски модификованим клиноптилолитом доводи до повећања концентрације и количине IgG и γ глобулина у колоструму.

Сви резултати добијени у овој студији показују позитиван ефекат деловања органски модификованог клиноптилолита на квалитет колострума првотелки. Исто тако јавља се потреба за даљим истраживањима молекулских и ћелијских механизма деловања овог препарата којим се остварују ови позитивни ефекти.

7. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата постигнутих у овом раду изведени су следећи закључци:

1. Процент суве материје у колоструму третиране групе првотелки био је значајно виши у односу на проценат средње вредности суве материје одређеног у контролној групи.
2. У колоструму третиране групе првотелки садржај масти је био значајно виши у поређењу са садржајем масти у колоструму контролне групе.
3. Првотелке третиране групе луче колострум који садржи значајно већи проценат протеина у односу на контролну групу.
4. Средња вредност процента W_{19} -а у колоструму третиране групе првотелки била је статистички значајно виша у односу на средњу вредност процента W_{19} -а одређену у колоструму контролне групе.
5. Колострум третираних првотелки садржи значајно већу концентрацију и масу имуноглобулина G класе (утврђених методом радијалне имунодифузије) од колострума контролне групе првотелки.
6. Колострални серум третираних првотелки садржи значајно већу концентрацију γ глобулина (утврђених електрофорезом у гелу агарозе) и укупних протеина од колостралних серума контролне групе првотелки.
7. Вредности процента W_{19} -а у колоструму високо корелирају са концентрацијом имуноглобулина G класе у колоструму (утврђених методом радијалне имунодифузије) и са концентрацијом γ глобулина (утврђених електрофорезом у гелу агарозе) и концентрацијом укупних протеина у колостралном серуму.
8. У серумима третиране групе првотелки није дошло до промена вредности ни једног од анализираних биохемијских/метаболичких параметара (укупни протеини, албумини, глукоза, уреа, триглицериди, холестерол, ВНВ, калцијум, магнезијум, фосфор) у односу на контролну групу.
9. У серумима третиране групе првотелки није дошло до промена концентрације, албумина, α , β и γ глобулина у односу на контролну групу.

10. У серумима третиране групе првотелки, у односу на контролу групу у интервалу 7 ± 3 дана пре тељења детектовано је благо смањење у релативном садржају спорих γ глобулина и благ пораст у релативном садржају брзих γ глобулина, док је 1. дана тељења детектован повећан релативни садржај спорих γ глобулина и смањен релативни садржај брзих γ глобулина.

Збирно резултати овог рада показују да првотелке које су добијале препарат зеолита Minazel Plus[®] дају колострум значајно бољег квалитета од колострума првотелки из контролне групе. Третирањем првотелки пред тељење препаратом Minazel Plus[®] који садржи органски модификован клиноптилолит постиже се ефекат лучења колострума са високим садржајем имуноглобулина G.

8. ЛІТЕРАТУРА

1. Alic UD, 2014, Efficacy of clinoptilolite supplementation on milk yield and somatic cell count, *Revista MVZ Córdoba*, 19, 4242-8.
2. Ames LL, 1967, Zeolitic removal of ammonium ions from agricultural wastewaters, *In Proceedings of 13th Pacific Northwest Industrial Waste Conference*, Pullman, Washington State University, 135-52.
3. Arthur GH, Noakes DE, Pearson H, 1996, The development of the conceptus, *Pregnancy and Parturition in Veterinary Reproduction and Obstetrics*, 7th Philadelphia, 51-109.
4. Barrington GM, Besser TE, Gay CC, Davis WC, Reeves JJ, McFadden TB, 1997, Effect of prolactin on in vitro expression of the bovine mammary immunoglobulin G1 receptor, *J Dairy Sci*, 80, 94-100.
5. Barrington GM, Besser TE, Gay CC, Davis WC, Reeves JJ, McFadden TB, Akers RM, 1999, Regulation of the immunoglobulin G receptor: effect of prolactin on in vivo expression of the bovine mammary immunoglobulin G receptor, *J Endocrinol*, 163, 25-31.
6. Barrington GM, McFadden TB, Huylar MT, Besser TE, 2001, Regulation of colostrogenesis in cattle, *Livest Prod Sci*, 70, 95-104.
7. Bartier AL, Windeyer MC, Doepel L, 2015, Evaluation of on-farm tools for colostrum quality measurement, *J Dairy Sci*, 98, 1878-84.
8. Bauman DE, Griinari JM, 2003, Nutritional regulation of milk fat synthesis, *Annu Rev Nutr*, 23, 203-27.
9. Baumrucker R, Blum JW, 1994, Effects of dietary recombinant human insulin-like growth factor-I on concentrations of hormones and growth factors in the blood of newborn calves, 140, *J Endocrinol*, 15-21.
10. Baumrucker CR, Burkett AM, Magliaro-Macrina AL, Dechow CD, 2010, Colostrogenesis: Mass transfer of immunoglobulin G1 into colostrum, *J Dairy Sci*, 93, 3031-8.
11. BaumruckerCR, Bruckmaier RM, 2014, Colostrogenesis: IgG1 transcytosis mechanisms, *J Mammary Gland Biol*, 19, 103-17.

12. *Bergero D, Rumello G, Sarra C, D'Angelo A*, 1997, Effect of natural clinoptilolite or phillipsite in the feeding of lactating dairy cows. In Kirov G., Filizova L., Petrov O, *Natural Zeolites – Sofia* 95, 67 – 72.
13. *Besser TE, Gay CC*, 1994, The importance of colostrum to the health of the neonatal calf, *Vet Clin N Am-Food A*, 10, 107-17.
14. *Bielmann V, Garner J, Throop C, Perkins N, Leslie K*, 2008, An evaluation of a Brix refractometer for measurement of colostrum quality and success of passive transfer, *J Dairy Sci*, 91, 354.
15. *Bielmann V, Gillan J, Perkins NR, Skidmore AL, Godden S, Leslie KE*, 2010, An evaluation of Brix refractometry instruments for measurement of colostrum quality in dairy cattle, *J Dairy Sci*, 93, 3713–21.
16. *Blum JW, Hammon H*, 2000a, Colostrum effects on the gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal calves, *Livest Prod Sci*, 66, 151-9.
17. *Blum JW, Hammon HM*, 2000b, Bovine colostrum: more than just an immunoglobulin supplier, *Schweiz Arch Tierh*, 142, 221-8.
18. *Bosi P, Creston D, Casini L*, 2002, Production performance of dairy cows after the dietary addition of clinoptilolite, *Ital J Anim Sci*, 1, 187-95.
19. *Brandon MR, Watson DL, Lascelles AK*, 1971, The mechanism of transfer of immunoglobulin into mammary secretion of cows, *Aust J Exp Biol Med Sci*, 49, 613-23.
20. *Buczinski S, Vandeweerd JM*, 2016, Diagnostic accuracy of refractometry for assessing bovine colostrum quality: A systematic review and meta-analysis, *J Dairy Sci*, 99: 7381-94.
21. *Butler JE*, 1985, Biochemistry and biology of ruminant immunoglobulins, *Progress in veterinary microbiology and immunology*, 2, 1-53.
22. *Calloway CD, Tyler JW, Tessman RK, Hostetler D, Holle J*, 2002, Comparison of refractometers and test endpoints in the measurement of serum protein concentration to assess passive transfer status in calves, *JAVMA-J Am Vet Med A*, 221,1605–8.
23. *Campana WM, Baumrucker CR*, 1995, Hormones and growth factors in bovine Milk. In: Jensen RG, *Handbook of Milk Composition*, San Diego, 476-94.

24. Cash RSG, 1999, Colostral quality determined by refractometry, *Equine Vet Educ*, 11, 36–8.
25. Cerón JJ, Caldin M, Martínez-Subiela S, 2010, Electrophoresis and acute phase protein measurement. In: Schalm's *Veterinary Hematology*, 6th, Ames, Iowa, 1157-61.
26. Chase CL, Hurley DJ, Reber AJ, 2008, Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response, *Vet Clin Food Anim*, 24, 87-104.
27. Chavatte P, Clément F, Cash R, Grongnet JF, 1998, Field determination of colostrum quality by using a novel, practical method, In *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*, 44, 206–9.
28. Chen JC, Chang JC, Peh HC, Chen SY, 1999, Serum protein levels and neonatal growth rate of Nubian goat kids in Taiwan area, *Small Ruminant Res*, 32, 153–60.
29. Chigerwe M, Tyler JW, Nagy DW, Middleton JR, 2008, Frequency of detectable serum IgG concentrations in precolostral calves, *Am J Vet Res*, 69,791-5.
30. Chigerwe M, Hagey VJ, 2014, Refractometer assessment of colostral and serum IgG and milk total solids concentrations in dairy cattle, *BMC Vet Res*, 10, 178.
31. Conneely M, Berry DP, Sayers R, Murphy JP, Lorenz I, Doherty ML, Kennedy E, 2013, Factors associated with the concentration of immunoglobulin G in the colostrum of dairy cows, *Animal*, 7, 1824-32.
32. Conte F, S Scarantino, 2013, A study on the quality of bovine colostrum: physical, chemical and safety assessment, *International Food Research Journal*, 20, 925-33.
33. Corbeil LB, Gogolewski RP, Kacskovics I, Nielsen KH, Corbeil RR, Morrill JL, Greenwood R, Butler JE, 1997, Bovine IgG2a antibodies to *Haemophilus somnus* and allotype expression, *Can J Vet Res*, 61, 207–13.
34. Croom WJ, Collier RJ, Bauman DE, Hays RL, 1976, Cellular studies of mammary tissue of cows hormonally induced into lactation and ultrastructure, *J Dairy Sci*, 59, 1232-46.
35. Dann HM, Varga GA, Putnam DE, 1999, Improving energy supply to late gestation and early postpartum dairy cows, *J Dairy Sci*, 82, 1765-78.
36. Davis CL, Drackley JK, 1998, In: *The development, nutrition, and management of the young calf*, 1st, Ames, Iowa, 179–206.

37. Devery-Pocius JE, Larson BL, 1983, Age and previous lactations as factors in the amount of bovine colostrum immunoglobulins, *J Dairy Sci*, 66, 221-6.
38. Dinsmore P, Skidmore A, 2008, Comparison of Brix (sugar) refractometer and colostrometer for evaluation of colostrum quality in dairy cows, *J Dairy Sci*, 91, 355.
39. Dixon FJ, Weigle WO, Vasquez JJ, 1961, Metabolism and mammary secretion of serum protein in the cow, *Lab Invest*, 10, 216-37.
40. Donovan SM, Odle J, 1994, Growth factors in milk as mediators of infant development, *Annu Review Nutr*, 14, 147-67.
41. Donovan DC, Reber AJ, Gabbard JD, Aceves-Avila M, Galland KL, Holbert KA, Ely LO, Hurley DJ, 2007, Effect of maternal cells transferred with colostrum on cellular responses to pathogen antigens in neonatal calves, *Am J Vet Res*, 68, 778-82.
42. Dschaak CM, Eun JS, Young AJ, Stott RD, Peterson S, 2010, Effects of supplementation of natural zeolite on intake, digestion, ruminal fermentation, and lactational performance of dairy cows, *The Professional Animal Scientist*, 26 647-54.
43. Dschaak CM, 2012, Use of rumen modifiers to manipulate ruminal fermentation and improve nutrient utilization and lactational performance of dairy cows, *PhD thesis*, Utah State University.
44. Dvorak M, 1989, The ability of bentonite and natural zeolite to adsorb aflatoxins from liquid media, *Vet Med-Czech*, 34:307-16.
45. Elfstrand L, Lindmark-Mansson H, Paulsson M, Nyberg L, Akesson B, 2002, Immunoglobulins, growth factors and growth hormone in bovine colostrum and the effects of processing, *Int Dairy J*, 12, 879-87.
46. Elsohaby I, McClure JT, Cameron M, Heider LC, Keefe GP, 2017, Rapid assessment of bovine colostrum quality: How reliable are transmission infrared spectroscopy and digital and optical refractometers?, *J Dairy Sci*, 100, 1427-35.
47. Filippidis A, Godelitsas A, Charistos D, Misaelides P, Kassoli-Fournaraki A, 1996, The chemical behavior of natural zeolites in aqueous environments: Interactions between low-silica zeolites and 1 M NaCl solutions of different initial pH-values. *Appl Clay Sci*, 11, 199-209.

48. Fleenor WA, Stott GH, 1980, Hydrometer test for estimation of immunoglobulin concentration in bovine colostrum, *J Dairy Sci*, 63, 973–77.
49. Fleenor WA, Stott GH, 1981, Single radial immunodiffusion analysis for quantitation of colostral immunoglobulin concentration, *J Dairy Sci*, 64, 740-7.
50. Fratrić N, Stojić V, Janković D, Šamanc H, Gvozdić D, 2005, The effect of a clinoptilolite based mineral adsorber on concentrations of immunoglobulin G in the serum of newborn calves fed different amounts of colostrum, *Acta Vet-Beograd*, 55, 11-21.
51. Fratrić N, Stojić V, Rajčić S, Radojičić B, 2007, The effect of mineral adsorbent in calf diet colostrum on the levels of serum immunoglobulin G, protein and glucose. *Acta Vet-Beograd*, 57, 169-80.
52. Foley JA, Otterby DE, 1978, Availability, storage, treatment, composition and feeding value of surplus colostrum: a review, *J Dairy Sci*, 61, 1033-60.
53. Galindo J, Elias A, Gonzalez MR, 1986, The effect of zeolite on ruminal bacteria population and its activity in heifers fed sunflower: sorghum silage, *Stud Surf Sci Catal*, 28, 1055-9.
54. Gapper LW, Copestake DE, Otter DE, Indyk HE, 2007, Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrum and dietary supplements: a review, *Anal Bioanal Chem*, 389, 93-109.
55. Godden S, 2008, Colostrum management for dairy calves, *Vet Clin Food Anim*, 24, 19 –39.
56. Goff JP, Horst RL, 1997, Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders, *J Dairy Sci*, 80, 1260-8.
57. Gornall AG, Bardwill CJ, David MM, 1949, Deterination of serum proteins by means of the biuret reaction, *J Biol Chem*, 177, 751-66.
58. Grabherr H, Spolders M, Lebzien P, Hutner L, Flachowsky G, Furll M, Grun M, 2009, Effect of zeolite A on rumen fermentation and phosphorus metabolism in dairy cows, *Arch Anim Nutr*, 63, 321-36.
59. Grusenmeyer DJ, Ryan CM, Galton DM, Overton TR, 2006, Shortening the dry period from 60 to 40 days does not affect colostrum quality but decreases colostrum yield by Holstein cows, *J Anim Sci*, 84, 336.

60. Guidry AJ, Paape MJ, Pearson RE, 1980, Quarter milk variation in immunoglobulins and ability to support phagocytosis, *J Dairy Sci*, 63, 611-5.
61. Guilloteau P, Le Huerou-Luron I, Chayvialle JA, Toullec R, Zabielski R, Blum JW, 1997, Gut regulatory peptides in young cattle and sheep, *Transbound Emerg Dis*, 44, 1-23.
62. Gulliksen SM, Lie KI, Solverod L, Osteras O, 2008, Risk factors associated with colostrum quality in Norwegian dairy cows, *J Dairy Sci*, 91, 704–12.
63. Guy MA, McFadden TB, Cockrell DC, Besser TE, 1994, Regulation of colostrum formation in beef and dairy cows, *J Dairy Sci*, 77, 3002–7.
64. Gvozdić D, Stojić V, Šamanc H, Fratrić N, Vujanac I, 2003, Biološki aktivna jedinjenja u kolostrumu: njihov značaj i mogućnost njihove resorpcije, *Veterinarski glasnik*, 57, 299-312.
65. Gvozdić D, Stojić V, Fratrić N, Pešut O, Jovanović I, Kirovski D, Šamanc H, Dimitrijević B, Vujanac I, 2007, Efficiency of immunoglobulin absorption in newborn calves receiving oral clinoptilolite treatment, *Group*, 2, 1-5.
66. Harker DB, 1978, A simple estimation of the immunoglobulin content of ewe colostrum, *Vet Rec*, 103, 8–9.
67. Hemken RW, Harmon RJ, Mann LM, 1984, Effect of clinoptilolite on lactating dairy cows fed a diet containing urea as a source of protein, *Zeol Agriculture, Use of Natural Zeolites in Agriculture and Aquaculture*, Westview Press, Boulder, Colorado, 171-6.
68. Hernandez D, Nydam DV, Godden SM, Bristol LS, Kryzer A, Ranum J, Schaefer D, 2016, Brix refractometry in serum as a measure of failure of passive transfer compared to measured immunoglobulin G and total protein by refractometry in serum from dairy calves, *Vet J*, 211, 82-7.
69. Hodgins DC, Shewen PE, 1996, Preparturient vaccination to enhance passive immunity to the capsular polysaccharide of *Pasteurella haemolytica* A1, *Vet Immunol Immunop*, 50, 67–77.
70. Hornig G, Scherping E, Hasselman L, 1999, The effect of the mineral clinoptilolite as feed additive for dairy cows, In Schubert R, Flachowsky G, Bitsch R, Jahreis G, *Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier*, 7th Symp Jena-Thuringen, Friedrich Schiller University, Jena, Germany, 527-530.

71. <http://www.akvarij.net/index.php/slatkovodna-akvaristika-othermenu-43/kemija/780-easy-life-ffm-ili-fluid-filter-medium>
72. <http://drtedwilliams.net/kb/index.php?pagename=Immunoglobulins>
73. <http://www.patent-co.com/minazel3.html>
74. <https://vimeo.com/48549575>
75. Johansson BG, 1972, Agarose gel electrophoresis, *Scand J Clin Lab Inv*, 124, 7–19.
76. Johnson MA, Sweeney TF, Muller LD, 1988, Effects of feeding synthetic zeolite A and sodium bicarbonate on milk production nutrient digestion, and rate of digesta passage in dairy cows, *J Dairy Sci*, 71, 946-53.
77. Jones PW, Collins P, Aitkin MM, 1988, Passive protection of calves against experimental infection with *Salmonella typhimurium*, *Vet Rec*, 123, 536–41.
78. Kacskovics I, Butler JE, 1996, The heterogeneity of bovine IgG2-VIII. The complete cDNA and deduced amino acid sequence of IgG2a(A) and IgG1, *Mol Immunol*, 33,189–95.
79. Kacskovics I, Wu Z, Simister NE, Frenyo LV, Hammarstrom L, 2000, Cloning and characterization of the bovine MHC Class I-like Fc receptor, *J Immunol*, 164, 1889-97.
80. Karatzia MA, Pourliotis K, Katsoulos PD, Karatzias H, 2011, Effects of in-feed inclusion of clinoptilolite on blood serum concentrations of alluminium and inorganic phosphorus and on ruminal pH and volatile fatty acid cocentrations in dairy cows, *Biol Trace Elem Res*, 142, 159-66.
81. Katsoulos PD, Roubies N, Panousis N, Arsenos G, Christaki E, Karatzias H, 2005, Effects of long-term dietary supplementation with clinoptilolite on incidence of parturient paresis and serum concentrations of total calcium, phosphate, magnesium, potassium, and sodium in dairy cows, *Am J Vet Res*, 66, 2081-5.
82. Katsoulos PD, Karatzia MA, Boscoc C, Wolf P, Karatzias H, 2016, In-field evaluation of clinoptilolite feeding efficacy on the reduction of milk aflatoxin M1 concentration in dairy cattle, *Journal of animal science and technology*, 58, 24.
83. Kehoe SI, Jayarao BM, Heinrichs AJ, 2007, A survey of bovine colostrum composition and colostrum management practices on Pennsylvania dairy farms, *J Dairy Sci*, 90, 4108–16.

84. Kehoe SI, Heinrichs AJ, Moody ML, Jones CM, Long MR, 2011, Comparison of immunoglobulin G concentrations in primiparous and multiparous bovine Colostrum, *The Professional Animal Scientist*, 27, 176–80.
85. Kickofen B, Hammer DK, Scheel D, 1968, Isolation and characterization of gamma G type immunoglobulins from bovine serum and colostrum, *Hoppe-seyler's Z Physiol Chem*, 349-51.
86. Kirovski D, Šamanc H, Prodanović R, 2012, Assessment of dairy cow energy status using milk fat, protein and urea concentrations, *Veterinarski glasnik*, 66, 97-110.
87. Korhonen H, Marnila P, Gill HS, 2000, Milk immunoglobulins and complement factors, *Brit J Nutr*, 84, 75 – 80.
88. Kovačić M, Marković D, Maslovarić I, Obrenović S, Grujić-Milanović J, Arsić A, Milanović Z, Savić O, Fratrić N, Ilić V, 2017, Serum proteins and lipids in mild form of calf bronchopneumonia: candidates for reliable biomarkers, *Acta Vet-Beograd*, 67, 201-21.
89. Kráčmar S, Zeman L, 2015, Change in composition of cow's colostrum within the first 72 hours after parturition, *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 52, 129-36.
90. Kubena LF, Harwey WE, Huff DE, Corrier TD, Philips RB, Rottinghaus GE, 1990, Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin, *Poultry Sci*, 69, 1078-86.
91. Kubena LF, Harwey WE, Huff DE, Elissalde MH, Yersini AG, Phillips RB, Rottinghaus GE, 1993a, Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and Diacetoxyscirpenol, *Poultry Sci*, 72, 51-9.
92. Kubena LF, Harwey WE, Huff DE, Elissalde MH, Phillips RB, Rottinghaus GE, 1993b, Effect of hydrated sodium calcium aluminosilicate on aflatoxicosis in broiler chicks, *Poultry Sci*, 72, 651-7.
93. Lacetera N, Bernabucci U, Ronchi B, Nardone A, 1996, Effects of selenium and vitamin E administration during a late stage of pregnancy on colostrum and milk production in dairy cows, and on passive immunity and growth of their offspring, *Am J Vet Res*, 57, 1776–80.
94. Larson BL, Heary HL, Devery JE, 1980, Immunoglobulin production and transport by the mammary gland, *J Dairy Sci*, 63, 665–71.

95. *Le Jan C*, 1996, Cellular components of mammary secretions and neonatal immunity: a review, *Vet Res*, 27, 403–17.
96. *Lee SH, Jaekal J, Bae CS, Chung BH, Yun SC, Gwak MJ, Noh GJ, Lee DH*, 2008, Enzyme-linked immunosorbent assay, single radial immunodiffusion, and indirect methods for the detection of failure of transfer of passive immunity in dairy calves, *J Vet Intern Med*, 22, 212-8.
97. *Liebler-Tenorio EM, Riedel-Caspari G, Pohlenz JF*, 2002, Uptake of colostrum leukocytes in the intestinal tract of newborn calves, *Vet Immunol Immunop*, 85, 33-40.
98. *Lokke MM, Engelbrecht R, Wiking L*, 2016, Covariance structures of fat and protein influence the estimation of IgG in bovine colostrum, *J Dairy Res*, 83, 58-66.
99. *Lopez GR, Elias A, Perez de la Paz J, Gonzalez G*, 1988, The utilization of zeolite by dairy cows. 1. The effect on milk composition, *Revista Cubana de Ciencia Agricola, Cuba*.
100. *Lopez GR, Elias A, Menchaca MA*, 1992, The utilization of zeolite by dairy cows. 2. Effect on milk yield, *Revista Cubana de Ciencia Agricola, Cuba*.
101. *Lorenz I, Mee JF, Earley B, More SJ*, 2011, Calf health from birth to weaning. I. General aspects of disease prevention, *Ir Vet J*, 16, 64, 1-8.
102. *MacFarlane JA, Grove-White DH, Royal MD, Smith RF*, 2015, Identification and quantification of factors affecting neonatal immunological transfer in dairy calves in the UK, *Veterinary record*, 176, 625.
103. *Mayer B, Kis Z, Frenyó LV, Hammarström L, Kacskovics I*, 2004, The neonatal Fc receptor (FcRn) is expressed in the bovine lung, *Vet Immunol Immunop*, 98, 85-9.
104. *McCarthy OJ, Singh K*, 2009, Physico-chemical properties of milk. In: *McSweeney PLH, Fox PF, Advanced dairy chemistry, vol 3: lactose, water, salts and minor constituents*, 3rd, Springer, New York.
105. *McCollum FT, Galyean ML*, 1983, Effects of clinoptilolite on rumen fermentation, digestion and feedlot performance in beef steers fed high concentrate diets, *J Anim Sci*, 56, 517-24.
106. *McGrath BA, Fox PF, McSweeney PL, Kelly AL*, 2016, Composition and properties of bovine colostrum: a review, *Dairy Sci Technol*, 96, 133-58.

107. McGuirk SM, Collins M, 2004, Managing the production, storage and delivery of colostrum, *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 20, 593-603.
108. Mechor GD, Gröhn YT, McDowell LR, Van Saun RJ, 1992, Specific gravity of bovine colostrum immunoglobulins as affected by temperature and colostrum composition, *J Dairy Sci*, 75, 3131-5.
109. Min BR, McNabb WC, Barry TN, Peters JS, 2000, Solubilization and degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (EC 4.1.1.39; Rubisco) protein from white clover (*Trifolium repens*) and *Lotus corniculatus* by rumen microorganisms and the effect of condensed tannins on these processes, *J Agr Sci*, 134,305–17.
110. Molkenntin J, 2000, Occurrence and biochemical characteristics of natural bioactive substances in bovine milk lipids, *Brit J Nutr*, 84, 47 –53.
111. Moore M, Tyler JW, Chigerwe M, Dawes ME, Middleton JR, 2005, Effect of delayed colostrum collection on colostral IgG concentration in dairy cows, *JAVMA- J Am Vet Med A*, 226, 1375–1377.
112. Moore DA, Taylor J, Hartman ML, Sischo WM, 2009, Quality assessments of waste milk at a calf ranch, *J Dairy Sci*, 92, 3503–9.
113. Morin DE, Constable PD, Maunsell FP, McCoy GC, 2001, Factors associated with colostral specific gravity in dairy cows, *J Dairy Sci*, 84, 937–43.
114. Morrill KM, Conrad E, Lago A, Campbell J, Quigley JD, Tyler H, 2012a, Nationwide evaluation of quality and composition of colostrum on dairy farms in the United States, *J Dairy Sci*, 95, 3997–4005.
115. Morrill KM, Conrad E, Polo J, Lago A, Campbell J, Quigley J, Tyler H, 2012b, Estimate of colostral immunoglobulin G concentration using refractometry without or with caprylic acid fractionation, *J Dairy Sci*, 95, 3987–96.
116. Morrill KM, Robertson KE, Spring MM, Robinson AL, Tyler HD, 2015, Validating a refractometer to evaluate immunoglobulin G concentration in Jersey colostrum and the effect of multiple freeze-thaw cycles on evaluating colostrum quality, *J Dairy Sci*, 98, 595-601.
117. Muller LD, Ellinger DK, 1981, Colostral immunoglobulin concentrations among breeds of dairy cattle, *J Dairy Sci*, 64, 1727–30.

118. Mumpton FA, Fishman PH, 1977, The application of natural zeolites in animal science and aquaculture, *J Anim Sci*, 45, 1188-203.
119. Mumpton FA, 1999, La roca magica: uses of natural zeolites in agriculture and industry, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 96, 3463-70.
120. Nansen P, 1970, Metabolism of bovine immunoglobulin-G. A clinical and pathophysiological study, *PhD thesis*, Munkagraad, Kopenhagen.
121. Nardone A, Lacetera N, Bernabucci U, Ronchi B, 1997, Composition of colostrum from dairy heifers exposed to high air temperatures during late pregnancy and the early postpartum period, *J Dairy Sci*, 80, 838-44.
122. Nestorov N, 1984, in: W.G. Pond, F.A. Mumpton, *Zeoagriculture. Use of Natural Zeolites in Agriculture and Aquaculture*, Westview Press Inc, Boulder, Colorado, 167.
123. Nezlin R, 1998, *The Immunoglobulins. Structure and Function*, Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto.
124. Nikkhah A, Goudarzi M, Mirhadi S, 2007, The effects of clinoptilolite on ruminal parameters of chal breed sheep, *Iranian Journal of Agricultural Sciences*, 38, 211-7.
125. NRC, 2001, *Nutrient Requirements of Dairy Cattle, 7th*, Natl Acad Press, Washington, DC.
126. Okamoto M, Robinson JB, Christopherson RJ, Young BA, 1986, Summit metabolism of newborn calves with and without colostrum feeding, *Can J Anim Sci*, 66, 937-44.
127. Pakkanen R, Aalto J, 1997, Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum, *Int Dairy J*, 7, 285-97.
128. Papaioannou D, Katsoulos PD, Panousis N, Karatzias H, 2005, The role of natural and synthetic zeolites as feed additives on the prevention and/or the treatment of certain farm animal diseases: a review, *Micropor Mesopor Mat*, 84, 161-70.
129. Petrović Radmila, 1991, Primena zeolita u brojlerskoj proizvodnji, *Magistarski rad*, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet Beograd.
130. Phipps AJ, Beggs DS, Murray AJ, Mansell PD, Pyman MF, 2017, Factors associated with colostrum immunoglobulin G concentration in northern-Victorian dairy cows, *Aust Vet J*, 95, 237-43.

131. Pike RM, 1967, Antibody heterogeneity and serological reactions, *Bact Rev*, 31, 157-74.
132. Placinta CM, D'mello JPF, Macdonald AMC, 1999, A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins, *Anim Feed Sci Technol*, 78, 21-37.
133. Pond W, 1982, Physiological role of zeolites in animal nutrition, *Zeo-Agriculture*, Rochester-USA.
134. Pritchett LC, Gay CC, Besser TE, Hancock DD, 1991, Management and production factors influencing Immunoglobulin G1 concentration in colostrum from Holstein cows, *J Dairy Sci*, 74, 2336-41.
135. Przybylska J, Albera E, Kankofer M, 2007, Antioxidants in bovine colostrum, *Reprod Domest Anim*, 42, 402-9.
136. Quigley JD, Lago A, Chapman C, Erickson P, Polo J, 2013, Evaluation of the Brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum, *J Dairy Sci*, 96, 1148-55.
137. Quiles AJ, Gonzalo C, Fuentes F, Hevia M, Sanchez JM, 1991, Protein composition and variation of caprine colostrum (Murciano-Granadina breed) by means of polyacrylamide-SDS gel electrophoresis, *Anim Sci*, 52, 311-6.
138. Rabbani H, Brown WR, Butler JE, Hammarstrom L, 1997, Genetic polymorphism of bovine IgG3, *Immunogenetics*, 46, 326-31.
139. Rajić I, Trajković D, Tomašević-Čanović M, Dumić M, Vukićević O, Bočarov A, 1994, Uticaj Mikozela dodatog u hranu za suprasne krmače kontaminisanu zearelenonom i ohratoksinom na rezultate prašenja, *Veterinarski glasnik*, 48, 881-8.
140. Rastani RR, Grummer RR, Bertics SJ, Gümen A, Wiltbank MC, Mashek DG, Schwab MC, 2005, Reducing dry period length to simplify feeding transition cows: Milk production, energy balance and metabolic profiles, *J Dairy Sci*, 88, 1004-14.
141. Reber AJ, Hippen AR, Hurley DJ, 2005, Effects of the ingestion of whole colostrum or cell-free colostrum on the capacity of leukocytes in newborn calves to stimulate or respond in one-way mixed leukocyte cultures, *Am J Vet Res*, 66, 1854-60.
142. Reschke C, Schelling E, Michel A, Remy-Wohlfender F, Meylan M, 2017, Factors associated with colostrum quality and effects on serum gamma globulin concentrations of calves in Swiss dairy herds, *J Vet Intern Med*, 31, 1563-71.

143. Richards BF, Janovick NA, Moyes KM, 2009, Comparison of a controlled-energy high fiber diet fed throughout the dry period to a two stage far off and close up dietary strategy, *J Dairy Sci*, 92, 140.
144. Saini SS, Farrugia W, Muthusamy N, Ramsland PA, Kaushik AK, 2007, Structural evidence for a new IgG1 antibody sequence allele of cattle, *Scand J Immunol*, 65, 32-8.
145. Santos JEP, DePeters EJ, JardonPW, Huber JT, 2001, Effect of prepartum dietary protein level on performance of primigravid and multiparous Holstein dairy cows, *J Dairy Sci*, 84, 213- 24.
146. Saoulidis K, Alexopoulos C, Papaioannou DS, Kritas SK, Kyriakis SC, 2001, Effect of the dietary inclusion of a natural zeolite (clinoptilolite) on aerial ammonia level in pig houses (In Greek), *J Hell Vet Med Soc*, 52, 292-8.
147. Sasaki M, Larson BL, Nelson DR, 1977, Kinetic analyses of the binding of the immunoglobulin IgG1 and IgG2 to bovine mammary cells, *BBA-Gen Subjects*, 497, 160-70.
148. Schabbacher FL, Smith KL, 1975, Formation and role of unusual whey proteins and enzymes: relation to mammary function, *J Dairy Sci*, 58, 1048-62.
149. Shah NP, 2000, Effects of milk-derived bioactives: an overview, *Brit J Nutr*, 84, 3–10.
150. Silva-del-Río N, Rolle D, García-Muñoz A, Rodríguez-Jiménez S, Valldecabres A, Lago A, Pandey P, 2017, Colostrum immunoglobulin G concentration of multiparous Jersey cows at first and second milking is associated with parity, colostrum yield, and time of first milking, and can be estimated with Brix refractometry, *J Dairy Sci*, 100, 5774-81.
151. Spring RC, Hulstein MFE, Van der Meer R, 2001, Bactericidal activities of milk lipids, *Antimicrob Agents Ch*, 45, 1298-301.
152. Stankov M, Rajić I, Popov D, Vukićević O, Miletić B, 1990, Uticaj zeolita dodatog hrani za krmače u laktaciji na zdravstveno stanje i gubitke prasadi na sisi, *X Skup svinjogojaca Jugoslavije*, Zbornik radova, Pančevo, 295-300.
153. Stankov M, Obradović V, Obradović J, Vukićević O, 1992, Uticaj mikozele na zdravstveno stanje i proizvodne rezultate zalučene prasadi, *Veterinarski glasnik*, 46, 91-6.

154. Stojić V, Šamanc H, Fratrić N, 1995, The effect of a clinoptilolite based mineral adsorber on colostral immunoglobulin G adsorption in newborn calves, *Acta Vet-Beograd*, 45, 67-74.
155. Stojić V, Gagrčin M, Kirovski D, Fratrić N, 1998, The effect of clinoptilolite based mineral adsorber immunoglobulin G absorption in newborn piglets, *Acta Vet-Beograd*, 48, 19-26.
156. Stojic M, Fratrić N, Kovačić M, Ilić V, Gvozdić D, Savić O, Đoković R, Valčić O, 2017, Brix refractometry of colostrum from primiparous dairy cows and new-born calf blood serum in the evaluation of failure of passive transfer, *Acta Vet-Beograd*, 67, DOI:10.1515/acve-2017-0041.
157. Sutton JD, Broster WH, Schuller E, Napper DJ, Broster VJ, Bines JA, 1988, Influence of plane of nutrition and diet composition on rumen fermentation and energy utilization by dairy cows, *J Agric Sci*, 110, 261–70.
158. Swan H, Godden S, Bey R, Wells S, Fetrow J, Chester-Jones H, 2007, Passive transfer of immunoglobulin G and preweaning health in Holstein calves fed a commercial colostrum replacer, *J Dairy Sci*, 90, 3857–66.
159. Sweeney TF, Cervantes A, Bull LS, Hemken RW, 1984, Effect of dietary clinoptilolite on digestion and rumen fermentation in steers, *Zeo-agriculture: use of natural zeolites in agriculture and aquaculture*, Boulder, Colo, Westview Press, 183-93.
160. Symons DB, Clarkson CA, Beale D, 1989, Structure of bovine immunoglobulin constant region heavy chain gamma 1 and gamma 2 genes, *Mol Immunol*, 26, 841-50.
161. Tizard IR, 1996, *Veterinary immunology*, 5th, WB Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo.
162. Tóthová C, Nagy O, Kovác G, 2013, The serum protein electrophoretic pattern and acute phase protein concentrations in calves with chronic respiratory diseases, *Acta Vet-Beograd*, 63, 473-86.
163. Tucker HA, 1985, Endocrine and neuronal control of the mammary gland. In: Larson BL, *Lactation*, The Iowa State University Press, Ames, IA, 39.

164. Tyler JW, Steevens BJ, Hostetler DE, Holle JM, Denbigh JJ, 1999, Colostral immunoglobulin concentrations in Holstein and Guernsey cows, *Am J Vet Res*, 60, 1136–9.
165. Vrzgula L, Prosbova M, Blazovsky J, Jacobi U, Schubert T, Kovac G, 1988, The Effect of Feeding Natural Zeolite on Indices of the Internal Environment of Calves in the Postnatal Period. In Kallo D, Sherry HS, *Occurrence, Properties and Utilisation of Natural Zeolites*, 747 – 52.
166. Vrzgula L, Seidel H, 1989, Sorption characteristics of natural zeolite (clinoptilolite) in biological material in vitro, *Vet Med-Czech*, 34, 537-44.
167. Wallace MM, Jarvie BD, Perkins NR, Leslie KE, 2006, A comparison of serum harvesting methods and type of refractometer for determining total solids to estimate failure of passive transfer in calves, *Can Vet J*, 47, 573–5.
168. Waltner-Toews D, Martin SW, Meek AH, McMillan I, Crouch CF, 1985, A field trial to evaluate the efficacy of a combined rotavirus-coronavirus Escherichia coli vaccine in dairy cattle, *Can J Comp Med*, 49, 1–9.
169. Weaver DM, Tyler JW, VanMetre DC, Hostetler DE, Barrington GM, 2000, Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves, *J Vet Intern Med*, 14, 569-77.
170. White JL, Ohlrogge AJ, Ion exchange materials to increase consumption of non-protein nitrogen in ruminants, 1974, *Canadian patent*, 939186.
171. Williams RC, Gibbons RJ, 1972, Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A. A mechanism of antigen disposal, *Science*, 177, 697-9.
172. Willis WL, Quarles CL, Fagerberg DJ, Shutze JV, 1982, Evaluation of zeolites fed to male broiler chickens, *Poultry Sci*, 61, 438-42.
173. Winger K, Gay CC, Besser TE, 1995, Immunoglobulin G1 transfer into induced mammary secretions: The effect of dexamethasone, *J Dairy Sci*, 78, 1306-9.
174. Xu RJ, 1996, Development of the newborn GI tract and its relation to colostrum/milk intake: a review, *Reprod Fert Develop*, 8, 35-48.
175. Zarcu S, Tulcan C, Samanc H, Kirovski D, Cernescu H, Mircu C, 2010, Clinical observation in calves fed colostrum supplemented with clinoptilolite, *Luc St Med Vet*, 43, 64-9.

Биографија

Милица Стојић је рођена 25. јануара 1989. године у Београду. Основну школу „20. октобар“ и IX гимназију „Михаило Петровић Алас“ завршила је у Београду. Школске 2007/08 године уписала је основне студије на Факултету ветеринарске медицине, Универзитета у Београду које је завршила 11. јула 2012. године са просечном оценом 9,62 и стекла звање доктора ветеринарске медицине. Током основних студија награђивана је од стране Факултета ветеринарске медицине за изузетан постигнут успех након сваке завршене године студија.

По завршетку основних студија, уписује докторске академске студије на Факултету ветеринарске медицине, Универзитета у Београду, на којима је положила све испите предвиђене студијским планом и програмом са просечном оценом 9,56. Од октобра 2013. године запослена је као асистент на Катедри за физиологију и биохемију, Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду. Од 2015. године укључена је као истраживач на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја под називом: „Биотехнологија у регулацији производног и репродуктивног статуса и здравственог стања код високо-млечних крава“.

До сада је објавила 10 научно-истраживачких радова од чега 3 у часописима међународног значаја (M22 и M 23 категорије).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана Милица В. Стојић
број индекса 16/2

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај пероралног давања органски модификованог клиноптилолита на
квалитет колострума првотелки

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

Потпис докторанда

У Београду, 18.12.2017.

М. Стојић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Милица В. Стојић _____
Број индекса _____ 16/2 _____
Студијски програм _____ докторске академске студије _____
Наслов рада Утицај пероралног давања органски модификованог
клинцитолита на квалитет колострума првотелки _____
Ментор _____ др Наталија Фратрић _____

Потписана _____ Милица В. Стојић _____

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____ 18.12.2017. _____

_____ М. Стојић _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Утицај пероралног давања органски модификованог клиноптилолита на квалитет колострума првотелки

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 18.12.2017.

M. Stojic