

3
4
5 **ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

6
7 **I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ:**

8
9 1. **Датум и назив органа који је именовео комисију:** Наставно-научно веће Факултета
10 ветеринарске медицине на 259. седници, 27.09.2024. год.

11
12 2. **Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива**
13 **уже научне области за коју је изабран у звање, годином избора у звање и назив**
14 **факултета, установе у којој је члан комисије запослен:**

15 **Напомена:** редослед чланова Комисије је такав да се прво наводе наставници са ФВМ а затим чланови
16 из других институција, сем у случају када је ментор дисертације из друге институције. Тада се ментор из
17 друге институције уписује под редним бројем 2, односно после ментора са ФВМ који је под редним бројем
18 1.

19 1. др Јелена Недељковић Траиловић, Ментор 1, редовни професор, Исхрана,
20 2018, tjelena@vet.bg.ac.rs

21 2. др. Мирјана Миловановић Ментор 2, ванредни професор, Фармакологија и
22 токсикологија, 2022, miram@vet.bg.ac.rs

23 3. др Дарко Маринковић, члан комисије, редовни професор, Патологија, 2021,
24 darko@vet.bg.ac.rs

25 4. др Драгољуб Јовановић, виши научни сарадник, 2022, Исхрана и ботаника,
26 djovanovic@vet.bg.ac.rs

27
28 5. Срђан Стефановић, виши научни сарадник, 2020, srdjan.stefanovic@inmes.rs

29
30 **II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:**

31
32 1. **Име, име једног родитеља, презиме:** Дарко Миладин Стефановић

33
34 2. **Датум рођења, општина, Република:** 08.07.1985. Бор

35
36 3. **Датум одбране, место и назив магистарске тезе*:** -

37
38 4. **Научна област из које је стечено академско звање магистра наука*:**

39
40 **III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

41 „Испитивање ефикасности вишекомпонентног препарата за детоксикацију у
42 превенирању штетних ефеката афлатоксина Б₁ и Т-2 токсина додатих у храну бројлера“

43
44 **IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (навести броја страна поглавља, слика,**
45 **шема, графикана и сл.):**

46 Докторска дисертација кандидата Дарка Стефановића је написана на 113 страна, и
47 састоји се из 8 поглавља: Увод (2 стране), Преглед литературе (42 стране), Циљ и
48 задаци рада (2 стране), Материјал и методе (7 страна), Резултати (25 страна),
49 Дискусија (12 страна), Закључци (2 стране) и Списак литературе (13 страна). На почетку
50 дисертације дати су захвалнице, кратак садржај на српском (2 стране) и енглеском
51 језику (2 стране), а на крају се налазе биографија и изјаве о ауторству, истовестности
52 штампане и електронске верзије, као и изјава о коришћењу дисертације. У писању
53 дисертације коришћено је 236 референци. Дисертација је документована са 27 табела
54 (5 табела у поглављу Преглед литературе, 3 табеле у поглављу Материјал и методе, 11
55 табела у поглављу Резултати и 9 табела у поглављу Прилози). Дисертација садржи

1 укупно 33 слике (10 у поглављу Преглед литературе и 23 у поглављу Резултати) и 12
2 графикана у поглављу Резултати.

3
4 **V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ** (дати кратак
5 опис сваког поглавља дисертације: увода-до 250 речи, прегледа литературе-до
6 500 речи, циља и задатака истраживања-није ограничено, материјал и метода-
7 није ограничено, резултата није ограничено, дискусије-до 100 речи, списка
8 референци-навести број референци у докторској дисертацији):

9 У поглављу „Увод“ кандидат најпре наводи да су микотоксини и микотоксикозе,
10 постали глобални проблем у модерном сточарству. Такође, наводи да је захваљујући
11 великом интересовању за ова једињења, као и брзом развоју модерних аналитичких
12 техника у последњих неколико деценија, до данас позната хемијска структура више од
13 400 микотоксина. Штете које настају као последица уношења микотоксина у организам
14 људи и животиња су вишеструке, по просторном захвату, глобалне и обухватају све
15 елементе ланца хране, од производње хране и хране за животиње до здравља људи и
16 животиња. По учесталости контаминације хране за животиње, на нашим просторима
17 најзначајнији је афлатоксин Б₁ (АфБ₁) док је од трихотеценских микотоксина
18 најзаступљенији Т-2 токсин. АфБ₁ је чест контаминент хранива и хране за животиње те
19 се из тог разлога његов утицај огледа у негативним ефектима на здравствено стање,
20 производне резултате животиња, присуство макроскопских и хистопатолошких
21 промена у органима и ткивима, као и присуству резидуа АфБ₁ и његових метаболита у
22 намирницама анималног порекла. Т-2 токсин, као најтоксичнији представник
23 трихотеценских микотоксина типа А, чест је загађивач хранива и хране за животиње.
24 Због тога може да испољи негативан утицај на здравствено стање и производне
25 резултате животиња, и проузрокује појаву патоанатомских и патохистолошких промена
26 у органима и ткивима. С обзиром на веома брзо метаболисање, резидуе Т-2 токсина и
27 његових метаболита се ретко могу наћи у крви и ткивима животиња. Новија
28 истраживања показују да су у борби са микотоксикозама код животиња боље резултате
29 од адсорбентних средстава појединачно, остварили мултикомпонентни препарати за
30 детоксикацију микотоксина. Ови детоксификатори обично садрже неорганско језгро
31 (зеолита, бентонита или др.) или глукоманане пореклом из ћелијског зида квасца, али и
32 микроорганизме који имају способност биодеградације молекула микотоксина, као и
33 ензиме који могу да изврше хемијску биотрансформацију молекула микотоксина до
34 мање токсичних једињења.

35
36 У поглављу „Преглед литературе“ кандидат веома концизно по поглављима
37 износи литературне податке о микотоксинима уопште, АфБ₁ и Т-2 токсину и њиховим
38 штетним ефектима код живине, као и могућностима коришћења савремених адитива у
39 борби против микотоксикоза животиња. Кандидат описује да су микотоксини
40 метаболити сапрофитских плесни, настали у њиховом секундарном метаболизму.
41 Синтетишу их углавном мицелијумске структуре плесни. Сматрало се да ова једињења
42 немају никакву улогу у расту и развоју плесни. Међутим, новија истраживања показују
43 да они вероватно делују одбијајуће на конкурентивне организме као што су бактерије,
44 вируси и инсекти у супстрату. Кандидат даље наводи да су најчешћи продуценти
45 микотоксина плесни из родова *Aspergillus*, *Fusarium* и *Penicillium*. Једна од најзначајнијих
46 група микотоксина су свакако афлатоксини. То су једињења бис-фуранокумаринске
47 структуре која продукују различите врсте плесни из рода *Aspergillus* (*A. flavus*, *A.*
48 *parasiticus*, *A. niger*). Ова група сродних једињења је широко распрострањена у природи.
49 До сада је откривено 18 различитих афлатоксина, а најзначајнији представник ове
50 групе, како са аспекта преваленце, тако и токсичности, је афлатоксин Б₁ (АфБ₁), за који
51 је утврђено да поседује низ биолошких активности, укључујући акутну и хроничну
52 токсичност, тератогеност, мутагеност и карциногеност. Кандидат у овом поглављу даје
53 приказ метаболичких путева и биотрансформације АфБ₁, као и податке о механизму
54 токсичности и токсичности АфБ₁ (подаци о LD₅₀ код различитих животињских врста
55 укључујући и живину). Кандидат истиче да су кикирики, кукуруз, јечам, пшеница као и
56 остала зрнаста хранива веома подложни инфестацији плеснима рода *Aspergillus* које
57 продукују АфБ₁, као и да се у њима често налазе значајне концентрације АфБ₁. Даље
58 износи податке из литературе о негативном утицају АфБ₁ на производне резултате
59 живине и то на телесну масу, прираст, конзумацију и конверзију хране. Кандидат такође
60 приказује податке о афлатоксикози живине и клиничким манифестацијама које их прате.

1 У посебном поглављу износи детаљан приказ утицаја АфБ₁ на макроскопске и и
2 хистопатолошке промене у јетри, танком цреву, срцу и Bursi fabricii код живине, као и
3 интензитету промена у зависности од унете дозе АфБ₁ и дужине изложености. На крају
4 поглавља о штетном утицају АфБ₁ код живине приказује литературне податке о
5 присуству АфБ₁ и његових метаболита у јестивим ткивима живине и намирницама
6 анималног порекла и њиховом значају са аспекта безбедности хране. Затим у наставку
7 даје литературне податке о Т-2 токсину. Кандидат износи да Т-2 токсин спада у велику
8 групу трихотеценских микотоксина. Т-2 токсин продукују плесни рода *Fusarium* (*F.*
9 *tricinctum*, *F. roseum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* i др.) које су чести контаминенти
10 хранива на пољу и ређе у складиштима. Расту као убиквитарни микроорганизми у
11 различитим срединама и условима, а значајно је да продукују токсин и на нижим
12 температурама (од 4 до 15°C). Даље у тексту износи податке о метаболизму и
13 биотрансформацији Т-2 токсина, као и о механизмима његовог штетног дејства код
14 живине и токсичности Т-2 токсина (кроз преглед LD₅₀ код различитих животињских
15 врста). Такође, наводи да контаминација овим микотоксином настаје „на пољу” и да су
16 најчешће контаминирани житарице кукуруз, јечам, раж, сирак као и потпуне смеше за
17 исхрану животиња. Кандидат даље износи податке о штетном утицају Т-2 токсина на
18 производне резултате живине и то на телесну масу, прираст, конзумацију и коефицијент
19 конверзије хране. Затим износи податке о Т-2 токсикозама живине и њеним клиничким
20 манифестацијама, макроскопским и хистопатолошким променама у јетри, дуоденуму,
21 срцу и Bursa fabricii. У посебном поглављу кандидат даје приказ присуства резидуа Т-2
22 токсина и његових метаболита у крви и јестивим ткивима живине, а описује и њихов
23 значају са аспекта безбедности хране. На крају кандидат даје приказ најчешће
24 коришћених адсорбената (зеолити и алуминосиликати) и мултикомпонентних препарата
25 у борби против афлатоксикога и Т-2 токсикога живине. Такође, приказани су и резултати
26 њихове ефикасности у борби против штетних ефеката АфБ₁ и Т-2 токсина, заједно или
27 појединачно као и коришћене дозе адсорбената или препарата за детоксикацију
28 микотоксина.

29 У поглављу „Циљ и задаци” кандидат наводи да је циљ ове докторске
30 дисертације био да се испита утицај изабраних доза АфБ₁ и Т-2 токсина, појединачно и
31 у комбинацији на здравствено стање, производне резултате, патоморфолошке промене
32 у таргет органима и присуство резидуа АфБ₁ и Т-2 токсина као и њихових метаболита у
33 јетри и грудној мускулатури бројлера.

34 Циљ ове тезе такође је био да се испита и процени ефикасност препарата за
35 детоксикацију микотоксина додатог у храну бројлера и могућност ублажавања штетних
36 ефеката АфБ₁ и Т-2 токсина појединачно и у комбинацији, на здравствено стање,
37 производне резултате, макроскопске и хистопатолошке промене у таргет органима као
38 и присуство резидуа АфБ₁ и Т-2 токсина као и њихових метаболита у јетри и грудној
39 мускулатури бројлера. За остваривање ових циљева постављени су следећи задаци:

40
41 1. Праћење здравственог стања и динамике угинућа

42 2. Праћење остварених производних резултата:

43 а. ТМ у седмодневним интервалима

44 б. прираст у седмодневним интервалима

45 в. конзумација хране (по фазама огледа и укупна)

46 г. коефицијент конверзије хране КК

47 3. Праћење макроскопских и хистопатолошких промена у:

48 а. дуоденуму

49 б. јетри

50 в. срцу

51 г. Bursi fabricii

52 4. Праћење присуства резидуа АфБ₁ и Т-2 токсина и њихових метаболита у

53 а. јетри

1 б. грудној мускулатури

2

3 У поглављу „Материјал и методе“ дати су сви детаљи експерименталног рада:

4 **Избор материјала**

5

6 Оглед је изведен у експерименталном делу Катедре за болести копитара,
7 месоједа, живине и дивљачи на Факултету ветеринарске медицине у Београду, на
8 укупно 96 једнодневних бројлера, оба пола, Cobb 500 провенијенце просечне телесне
9 масе на почетку огледа $51,71 \pm 0,4$ g. Оглед је трајао 42 дана.

10

11 **Држање и храњење експерименталних животиња**

12

13 У току трајања огледа бројлери су држани у подном систему а као простирка
14 коришћена је пиљевина дрвета. Просторија у којој је спроведен оглед припремљена је
15 пре почетка огледа. У објекту где је обављен оглед, зоохигијенски и микроклиматски
16 услови су у потпуности одговарали технолошким нормативима за дату провенијенцу.

17 Огледне јединке су храњене потпуним смешама за исхрану бројлера у тову
18 (производња Patent Co), сировинског и хемијског састава који се мењао у зависности од
19 узраста огледних животиња. Бројлери су храњени потпуним смешама стандардног
20 сировинског састава које су задовољавале у потпуности потребе огледних јединки
21 различитих старосних категорија. Смеша за почетни тов 1-21. дана, смеша за пораст од
22 22-35. дана и смеша за завршни тов од 35-42. дана. Бројлери су напајани из ручних
23 појилица, вода је мењана свакодневно. Исхрана и напајање бројлера током огледа
24 била је по вољи (*ad libitum*).

25

26 **Припрема контаминираниог материјала са микотоксинима за оглед**

27

28 За припрему контаминираниог материјала са АфБ₁ коришћена је култура
29 *Aspergillus parasiticus* (CBS 123.62) из базе у Холандији (Westerdijk Fungal Biodiversity
30 Institute). У лабораторијску стаклену чашу од 2 l одмерено је 1 kg грубо самлевеног
31 кукуруза на Varing млину. Чаша са кукурузом је прекривена алуфолијом и постављена у
32 аутоклав на стерилизацију на 121°C, 30 минута. У охлађен стерилисан кукуруз додато је
33 150 ml стерилисане дестиловане воде и остављено је да одстоји 30 минута. Након тога
34 додате су две Петријеве плоче са културом *A. parasiticus* (културе су култивисане на
35 кромпировом декстрозном агару 15 дана) и садржај је промешан стерилним штапићем.
36 Стаклена посуда је прекривена перфорираном алуминијумском фолијом.
37 Контаминирани кукуруз је постављен у термостат да се инкубира 15 дана на 25°C,
38 садржај је свакодневно аерисан. Након потребног периода инкубације, контаминирани
39 кукуруз је поново аутоклавиран на 121°C током 30 минута, а затим стављен у сушницу
40 на 105°C, 48 h. Контаминирани материјал је самлевен и анализиран на садржај АфБ₁
41 техником течне хроматографије купловане са масеном спектрометријом (Agilent 6460с
42 LC-MS/MS). У 1 kg на овај начин контаминираниог кукуруза детектовано је 264 mg АфБ₁.

43 За припрему контаминираниог материјала Т-2 токсином коришћена је култура *Fusarium*
44 *langsethiae* (Fe 2391 референтни материјал куће). У лабораторијску стаклену чашу од 2L
45 одмерен је 1 kg грубо самлевеног кукуруза на Varing млину. Чаша са кукурузом је
46 прекривена алуфолијом и постављена у аутоклав на стерилизацију на 121°C, 30
47 минута. На охлађен стерилисан кукуруз додато је 150 ml стерилисане дестиловане воде
48 и остављено је да одстоји 30 минута. Након тога додате су четири Петријеве плоче *F.*
49 *langsethiae* (култивисане на кромпировом декстрозном агару 15 дана) и садржај је
50 промешан стерилним штапићем. Стаклена посуда је прекривена перфорираном
51 алуминијумском фолијом. Контаминирани кукуруз је постављен у термостат да се
52 инкубира 10 дана на 10°C, садржај је свакодневно аерисан. Након инкубације,
53 контаминирани кукуруз је поново аутоклавиран на 121 °C 30 минута, а затим стављен у
54 сушницу на 105°C, 48 сати. Контаминирани материјал је самлевен и анализиран на
55 садржај Т-2 токсина техником течне хроматографије купловане са масеном
56 спектрометријом (Agilent 6460с LC-MS/MS). У 1 kg овако контаминираниог кукуруза
57 детектовано је 175 mg Т-2 токсина.

58

1 **Препарат за детоксикацију микотоксина (МР) коришћен у огледу**

2
3 Мултикомпонентни препарат за детоксикацију микотоксина (МР) садржи
4 физички активно језгро зеолита (модификовани зеолит клиноптилолит), споре *Bacillus*
5 *subtilis*, *Baccillus licheniformis*, *Saccharomyces cerevisiae* (ћелијски зид квасца) и
6 силимарин (фитогена хепатопротективна материја). Овај препарат је формулисан тако
7 да испољава оптималне ефекте код животиња.
8

9 **Формирање огледа**

10
11 Оглед је изведен на укупно 96 бројлера подељених методом случајног избора у осам
12 група. Контролне и огледне групе имале су подједнак број животиња (по 12).
13

- 14 -Е-I група, храна са додатком 0,1 mg/АфБ₁/kg хране
15 -Е-II група, храна са додатком 0,1 mg/АфБ₁/kg хране + 0,2% МР препарата
16 -Е-III група, храна са додатком 0,5 mg/Т-2 токсина/kg хране
17 -Е-IV група, храна са додатком 0,5 mg/Т-2 токсина/kg хране + 0,2% МР
18 препарата
19 -Е-V група, храна са додатком 0,1 mg/АфБ₁/kg хране+0,5 mg/Т-2 токсина/kg
20 хране
21 -Е-VI група, храна са додатком 0,1 mg/АфБ₁/kg хране+0,5 mg/Т-2 токсина/kg
22 хране+0,2% МР препарата
23 -К-група комерцијална смеша за исхрану бројлера без додатака
24 -МР-група комерцијална смеша за исхрану бројлера + 0,2% препарата МР
25

26 **Методe испитивања**

27
28 Да би се добили научно валидни резултати, примењиви у пракси, коришћене су
29 савремене технике и методе испитивања, као и савремене математичко-статистичке
30 методе за обраду и приказивање добијених резултата.
31

32 **Здравствено стање**

33 Поред превентивног програма здравствене заштите, све животиње у огледу биле су
34 под сталним ветеринарско-медицинским надзором, а све промене здравственог стања
35 свакодневно су праћене и евидентирани. Свакодневна опсервација вршена је
36 појединачном и групном адспекцијом.

37 **Хемијске анализе хране**

38 Узорци хране за предвиђена лабораторијска испитивања узимани су на почетку сваке
39 фазе огледа, односно 1. и 21. и 35. дана. Анализирани су хемијски састав хране која је
40 коришћена за исхрану бројлера. За потребе испитивања коришћене су следеће
41 стандардне методе:

- 42 -Одређивање садржаја сирових протеина према методи SRPS ISO 5983/2001.
43 -Одређивање садржаја влаге и других испарљивих материја према методи SRPS ISO
44 6496/2001.
45 -Одређивање садржаја масти према методи SRPS ISO 6492/2001
46 -Одређивање садржаја сировог пепела према методи SRPS ISO 5984/2002
47 -Одређивање садржаја калцијума (волуметријска метода) према SRPS ISO 6490-1/2001.
48 -Одређивање садржаја фосфора (спектрометријска метода) према SRPS ISO
49 6491/2002.
50 -Одређивање садржаја сирове целулозе (метода са међуфилтрацијом) према SRPS
51 ISO 6865/2004.
52 -Одређивање безазотних екстрактивних материја (БЕМ)
53 Садржај безазотних екстрактивних материја (БЕМ) (%) одређен је рачунски према
54 формули: БЕМ = 100 – (% влага + % пепео + % целулоза + % протеини + % маст).
55 -Одређивање садржаја АфБ₁ и Т-2 токсина у храни за животиње извршено је техником
56 течне хроматографије купловане са масеном спектрометријом на апарату Agilent 6460с
57 LC-MS/MS.
58
59

1

2 **Производни резултати**

3 Контролна мерења огледних јединки извршена су при усељавању једнодневних
4 бројлера, као и у седмодневним интервалима до краја огледа (1., 7., 14., 21., 28., 35. и
5 42. дана). Контролна мерења огледних животиња извршена су на електронској ваги са
6 тачношћу 10^{-2} g. На основу резултата мерења израчунавана је просечна ТМ на крају
7 сваке недеље, као и за цео оглед збирно. На основу разлике ТМ на почетку и крају
8 сваке недеље израчунаван је укупан дневни прираст. Током целог огледа, у
9 седмодневним интервалима, вршено је мерење утрошка хране за сваку групу. Исто
10 тако, на основу количине утрошене хране и прираста јединки током огледа, израчунат је
11 КК хране за сваку групу.

12 **Макроскопски и хистопатолошки преглед**

13 На крају експерименталног периода 42. дана огледа, непосредно после жртвовања
14 животиња урађена је обдукција и детаљни макроскопски преглед органа. Након
15 макроскопског прегледа узоркована су ткива дуоденума, јетре, срца и Bursa fabricii за
16 хистопатолошка испитивања. Ткива су фиксирана у 10% неутралном пуферизованом
17 формалину и након стандардне обраде у аутоматском ткивном процесору ткива су
18 укалупљена у парафинске блокове. Исечци ткива дебљине 3-5 μm су бојени
19 хематоксилином и еозином (HE)

20 **Испитивање присуства и садржаја резидуа АфБ₁ и његових метаболита, као и** 21 **резидуа Т-2 токсина и његових метаболита у јетри и грудној мускулатури** 22 **бројлера**

23

24 За испитивање садржаја резидуа АфБ₁, Т-2 токсина, и њихових метаболита
25 (АфМ₁, ХТ-2 токсина, Т2-триола и Т-2 тетраола) у ткивима коришћена је техника течне
26 хроматографије купловане са масеном спектрометријом (Agilent 6460c LC-MS/MS).

27 Узорци грудне мускулатуре и јетре су били хомогенизовани у блендеру. Два
28 грама хомогенизованог узорка је преливено са 10 ml раствора за екстракцију (80%
29 ацетонитрил: 15% вода: 5% мравља киселина), потом је смеша постављена на
30 орбиталну мешалицу у току 1 сата на собној температури, да би се извршила
31 екстракција микотоксина. Након екстракције, узорци су стављени у центрифугу 4200
32 обртаја/минути, током пет минута. Из бистрог дела екстракта одвојено је 7 ml течности у
33 нову тубу и додато је 2,8 g MgSO₄ и 0,7 g NaCl. Поступак је настављен енергичним
34 мешањем у вортексу у току 60 секунди. Узорци су поново центрифугирани (5 минута на
35 4200 обртаја/минути). Из бистрог дела раствора узето је 1 ml у стаклену виалу, на то је
36 додато 250 μl воде и промешано. Додатно пречишћавање екстракта од масти
37 (фосфолипида) је урађено на EMR Captiva колоници, 1,25 ml екстракта је уз помоћ
38 гравитационе силе пропуштено кроз колоницу. Одмашћени екстракт је упарен до сувог
39 у евапоратору (40°C, 1500 обртаја/мин.) и реконституисан са 500 μl раствора за
40 реконституцију (50% ацетонитрил: 50% вода и 0,1% мравља киселина). Тако
41 припремљен узорак је профилиран преко најлонског шприц филтера (0,22 μm) у чисту
42 стаклену виалу и анализиран LC MS/MS техником. Аналитичка колона коришћена за
43 раздвајање анализата је Agilent ZORBAX Rapid Resolution (Agilent, Palo Alto, CA, USA) HD
44 2.1 x 50 mm 1,8 μm са предколоном ZORBAX Eclipse Plus C18, 2,1 mm, 1,8 μm . Услови
45 за хроматографију, мобилне фазе, време и проток у ml/min. дати су табели 8. поглавље
46 докторске дисертације „Материјал и методе”.

47

48 **Место где је спроведено истраживање:**

49 Оглед је изведен у експерименталном делу Катедре за болести копитара, месоједа,
50 живине и дивљачи на Факултету ветеринарске медицине у Београду, одобрен и
51 намењен од стране Ветеринарске инспекције за огледе на живини (соба 1 и 2).
52 Животиње су жртване хуманом методом (метода је наведена у дозволи етичке
53 комисије Број: 323-07-02413/2019-05/1) у делу за еутаназiju животиња. Након тога
54 жртвоване животиње пребачене су у салу за обдукцију, Катедре за Патологију,
55 Факултета ветеринарске медицине, где је извршен макроскопски преглед и где су узети
56 узорци ткива за хистопатолошка испитивања, као и узорци ткива за испитивање

1 резидуа АфБ₁, Т-2 токсина и њихових метаболита. Испитивање присуства и садржаја
2 резидуа АфБ₁, Т-2 токсина и њихових метаболита у јетри и грудној мускулатури
3 извршено је у испитној лабораторији Patent со, Мишићево.

5 **Статистичка обрада података**

6 Добијени резултати разврстани су у одговарајуће статистичке серије и обрађени
7 уз примену програма GraphPad Prism 8.0, чиме је омогућено објективно и егзактно
8 закључивање. За статистичку анализу коришћене су следеће методе: мере варијације и
9 метод анализе варијансе са непарним т-тестом и Тукеу тестом. Израчунавани су
10 следећи статистички параметри: аритметичка средина (\bar{X}), стандардна грешка (SE),
11 стандардна девијација (Sd), коефицијент варијације (Cv) и интервал варијације (Iv).
12 Мере варијације су омогућиле да се прати варијабилитет унутар сваког обележја, како
13 апсолутно тако и релативно, а преко коефицијента варијације и поређења варијација
14 између обележја. Међусобно поређење свих третмана вршено је методом анализе
15 варијансе "F" тестом. Коришћењем Тукеу и Т-теста вршена је даља анализа
16 статистичке значајности разлика између појединих третмана. Сви тестови су корићени
17 на нивоу ризика од 5% и 1% и 0,1%, па су према томе и закључци дати са
18 одговарајућом вероватноћом (95, 99 и 99,99%). Добијени и обрађени резултати су
19 приказани у виду табела, графикона и слика.

21 Поглавље "**Резултати**" је ради боље прегледности подељено је на подпоглавља:

22 **Хемијске анализе у храни за животиње:**

23 Резултати хемијске анализе показују да су смеше у потпуности одговарале
24 категоријама бројлера којима су намењене као и нормативима за исхрану, у односу на
25 провенијенцу бројлера.

26 Све смеше које су коришћене у огледу биле су пре умешавања контаминираног
27 материјала анализирани на присуство и садржај АфБ₁, АфБ₂, АфГ₁, АфГ₂, Т-2 токсина,
28 ХТ-2 токсина, охратоксина А и зеараленена. У анализираним смешама нису пронађени
29 испитивани микотоксини.

30 Токсиколошким испитивањима смеша проверен је степен умешаности контаминираног
31 материјала са АфБ₁ и Т-2 токсином у храну за бројлере. Токсиколошка испитивања су
32 показала веома добар степен умешаности контаминираног материјала АфБ₁ и Т-2
33 токсина у комерцијалну храну са дозвољеним одступањем од $\pm 2\%$

34 **Здравствено стање животиња:**

35 Здравствено стање животиња у огледу праћено је током целог експерименталног
36 периода. Бројлери контролне групе као и групе која је добијала препарат МР, били су
37 складне телесне грађе, правилно развијеног коштаног и мишићног система, живахног
38 темперамента и добре кондиције. Перје, кожа и видљиве слузнице биле су без
39 особености. Апетит је био добар, а фецес уобичајено формиран. Способност активног
40 кретања и координација покрета били су усклађени, а мишићни тонус без особености.
41 Код огледних група бројлера нису уочени изражени клинички знаци поремећаја
42 здравственог стања. Бројлери огледне групе V и VI имали су слабије развијено мишићно
43 ткиво у односу на бројлере осталих огледних група. Током огледа није било угинућа,
44 бројлера контролних и огледних група.

46 **Производни резултати:**

47 Телесне масе бројлера у огледу

48 Првог дана огледа, бројлери огледних и контролних група имали су
49 одговарајућу ТМ за узраст и провенијенцу. Седмог дана огледа бројлери Е-I групе који
50 су храном добијали 0,1mg АфБ₁/kg хране имали су статистички значајно ниже ТМ

1 (P<0,01) у односу на бројлере E-II групе који су храном уз 0,1 mg АфБ₁/kg хране
2 добијали и препарат МР. Такође, бројлери E-III групе који су храном добијали 0,5 mg T-
3 2 токсина/kg хране имали су статистички значајно ниже ТМ (P<0,001) у односу на
4 бројлере E-IV групе који су храном уз 0,5mg T-2 токсина добијали и 0,2% препарата МР.
5 Најниже ТМ седмог дана огледа остварили су бројлери E-V групе који су храном
6 добијали комбинацију АфБ₁ и T-2 токсина, као и бројлери E-VI групе који су храном уз
7 ова два токсина добијали и 0,2% препарата МР. Између ТМ бројлера E-V и E-VI групе
8 није било статистички значајних разлика. Овакав тренд кретања ТМ задржао се до краја
9 огледа. На крају огледа 42. дана, бројлери E-I групе који су храном добијали 0,1mg/kg
10 АфБ₁ остварили су ТМ од 1826,0±12,64 g, док су бројлери E-II групе који су храном уз
11 АфБ₁ добијали и препарат МР остварили ТМ од 2055,0±10,2 6g. Између ТМ бројлера
12 ове две групе запажа се статистички значајна разлика на нивоу (P<0,001). Такође, на
13 крају огледа бројлери E-III групе који су храном добијали 0,5mg T-2 токсина/kg хране
14 остварили су просечне ТМ од 1828±13,31 g, и њихове ТМ биле су статистички значајно
15 ниже у односу на бројлере E-IV групе (P<0,001) који су храном уз T-2 токсин добијали и
16 0,2% МР за детоксикацију микотоксина. Ова група бројлера је остварили ТМ од
17 2054±7,98 g просечно. Најниже ТМ код бројлера огледних група остварили су бројлери
18 E-V и E-VI групе и то 1692±1,91 g и 1742±4,91 g и између њих није било статистички
19 значајних разлика. Оно што се јасно види је да су бројлери E-II и E-IV групе који су уз
20 АфБ₁ и T-2 токсин појединачно добијали и 0,2% МР препарата имали више ТМ за
21 12,5% и 12,36% у односу на бројлере E-I и E-III групе, што можемо приписати
22 позитивном утицају препарата МР. Наравно, овај позитиван утицај је само делимичан,
23 с обзиром да до краја огледа, бројлери E-II и E-IV групе нису достигли ТМ бројлера
24 контролних група. Оно што можемо да констатујемо је да су бројлери E-V групе који су
25 храном добијали комбинацију оба токсина и E-VI групе који су уз ова два токсина
26 добијали и 0,2% МР имали најниже ТМ од свих бројлера у огледу, и да код групе која је
27 уз токсине добијала МР није дошло до значајнијег повећања ТМ. Овакав резултат може
28 се приписати снажном синергистичком негативном дејству АфБ₁ и T-2 токсина на ТМ
29 бројлера и конзумацију хране, те и да је учинак препарата МР био слабији. Седмог дана
30 огледа, највише ТМ остварили су бројлери K-групе, као и МР групе који су уз
31 комерцијалну храну добијали 0,2% препарата МР. Између ТМ бројлера (K групе
32 2336,0±7,35 g и МР групе 2542,0±9,36 g) остварене су статистички значајне разлике на
33 нивоу (P<0,001) 42. дана огледа. Највише ТМ остварили су бројлери МР групе, што се
34 може приписати утицају препарата који осим адсорбтивних компоненти (за адсорпцију
35 микотоксина) садржи и пробиотске културе микроорганизама и фикофитне материје које
36 могу деловати позитивно на имунски систем и здравље гастроинтестиналног тракта
37 бројлера.

38 Прираст бројлера током огледа:

39 Иако је ТМ добар показатељ, сматра се да дневни прираст поузданије карактерише
40 квалитет хране, а посебно хигијенску исправност и здравствено стање животиња.
41 Поредеди огледне са контролном групом уочава се да АфБ₁ и T-2 токсин негативно
42 делују на остварен дневни прираст животиња. Бројлери огледне групе E-I који су
43 храном добијали 0,1mg АфБ₁/kg хране имали су статистички значајно ниже дневне
44 прираст (P<0,01 и P<0,001) у току прве, четврте, пете и шесте недеље испитивања у
45 односу на бројлере огледне групе E-II који су храном уз АфБ₁ добијали и 0,2%
46 препарата МР. Посматрајући збирно за цео оглед од 1.- 42. дана бројлери E-I групе
47 остварили су просечан дневни прираст од 147,66 ±0,99 g, док су бројлери E-II групе који
48 су уз АфБ₁ добијали и 0,2% препарата за детоксикацију МР остварили за цео период
49 огледа просечан дневни прираст од 167±0,85 g. Између прираста бројлера ове две
50 групе детектована је статистичка значајна на нивоу (P<0,001) На основу овога
51 можемо закључити да су бројлери E-II групе остварили за 13,09% више дневне
52 прирасте током целог огледа, што се може приписати учинку препарата МР. Ипак до
53 краја огледа бројлери E-II групе нису достигли прирасте предвиђене нормативом за
54 провинијенцу и због тога констатујемо да је протективни ефекат препарата делимичан.
55 Сличан тренд забележен је и код бројлера E-III и E-IV групе који су храном добијали 0,5
56 mg T-2 токсина/kg хране и такође, уз 0,5 mg T-2 токсина/kg хране и 0,2% препарата МР.
57 Бројлери E-III групе посматрано за цео оглед од 1.-42. дана остварили су просечан
58 дневни прираст од 148±1,12 g док су бројлери E-IV групе који су уз T-2 токсин добијали

0,2% препарата МР остварили за 12,7% више прирасте у односу бројлере Е-III групе или $166,83 \pm 0,68$ g. Између прираста бројлера Е-III и Е-IV група забележена је статистички значајна разлика на нивоу ($P < 0,001$). Најниже дневне прирасте посматрано за цео период огледа остварили су бројлери Е-V и Е-VI групе који су храном добијали комбинацију АфБ₁ и Т-2 токсина као и комбинацију оба микотоксина и препарат за детоксикацију МР. Бројлери Е-V и Е-VI групе остварили су од 1.- 42. дана просечне дневне прирасте од $137,1 \pm 0,43$ g односно $140,9 \pm 0,43$ g. Иако је нумеричка разлика у оствареним прирастима мала, детектована је статистички значајна разлика на нивоу ($P = 0,0222$). Разлози су са једне стране, негативни ефекти оба микотоксина на ТМ и прираст, са друге стране бројлери Е-V и Е-VI групе конзумирали су значајно ниже количине хране у односу на бројлере група који су храном добијали појединачно АфБ₁ и Т-2 токсин. Због снажног синергистичког негативног ефекта оба токсина на прираст бројлера ових група, забележено је само незнатно повећање просечног дневног прираста код бројлера Е-VI групе. Просечно највише дневне прирасте током огледа остварили су бројлери МР групе који су добијали храну са додатком 0,2% препарата МР и то $207,5 \pm 0,80$ g (од 1.-42. дана огледа) као и бројлери К групе који су добијали комерцијалну храну без додатака и то $190,4 \pm 0,61$ g. Ове разлике су током четврте и шесте недеље као и посматрано збирно за цео оглед, биле статистички значајне на нивоу $P < 0,05$ и $P < 0,001$ у односу на бројлере К групе, који су добијали комерцијалну храну без додатака. Овакви резултати бројлера МР групе могу се приписати утицају препарата који осим адсорбтивних компоненти (за адсорбцију микотоксина) садржи и пробиотске културе микроорганизама и фикофитне материје које потенцијално могу деловати позитивно на имунски систем и здравље гастроинтестиналног тракта бројлера.

Конзумација хране током огледа:

Конзумација хране огледних група је веома важан податак за овакву врсту испитивања, јер нам даје податке о количини токсина који су бројлери унели. Такође је јако битна због праћења уноса и потрошње хране као и економских параметара това. Посматрано збирно за цео оглед од 1.- 42. дана, бројлери огледне групе Е-I који су храном добијали 0,1mg АфБ₁/kg хране конзумирали су за 7,17% мање хране или укупно (3898,96 g) од бројлера Е-II групе који су уз АфБ₁ добијали и 0,2% препарата за детоксикацију и који су збирно за цео оглед конзумирали 4200 g. Бројлери Е-III групе који су храном добијали 0,5 mg Т-2 токсина/kg хране конзумирали су за 7,05% мање хране или (3906 g) у односу на бројлере Е-IV групе који су храном уз Т-2 токсин добијали и 0,2% препарата МР, посматрајући збирно за цео оглед. Бројлери Е-IV групе конзумирали су укупно 4202 g хране. Бројлери Е-V групе конзумирали су за 11,66% и 11,82% мање хране у односу на бројлере Е-I и Е-III групе или укупно за цео оглед (3444,42 g) Бројлери Е-VI групе конзумирали су током целог огледа 3546 g хране) или свега 2,88% више од бројлера Е-V групе. Бројлери контролне и групе МР конзумирали су уобичајене количине хране за старост и провинијенцу (4112,64 g и 4233 g). Занимљиво је да су бројлери групе Е-II и Е-IV посматрано за цео оглед конзумирали уобичајене количине хране по нормативу, али су због негативног утицаја АфБ₁ и Т-2 токсина остварили ниже ТМ и прирасте. Предпостављамо да је на боље резултате конзумације хране код ових група утицао препарат МР који су бројлери добијали храном уз АфБ₁ и Т-2 токсин.

Коефицијент конверзије хране (КК)

КК хране је добар показатељ успешности и економске оправданости това. КК био је нижи код бројлера контролних група у односу на огледне групе. Бројлери који су храном добијали АфБ₁ (Е-I) или Т-2 токсин (Е-III) имали су највиши КК, 2,2 kg, док су нешто ниже КК хране остварили бројлери који су храном добијали АфБ₁ уз додаток испитиваног препарата МР (Е-II) или бројлери који су храном добијали Т-2 токсин са додатком изабраног препарата МР (Е-IV) и он је износио 2,1kg. Код група бројлера која су храном добијала 0,1 mg/kg АфБ₁ и 0,5 mg/kg Т-2 токсина резултати КК износили су 2,1 kg за обе групе (Е-V и Е-VI), што је нешто ниже у односу на бројлере Е-I и Е-III групе.

1 Разлог је вероватно кумулативни ефекат два токсина, па су обе групе (E-V и E-VI)
2 конзумирале ниже количине хране у односу на бројлере E-I и E-III групе.

3 Најбоље резултате конверзије остварила је група која је уз комерцијалну храну
4 добијала и испитивани препарат МР и он је износио 1,7 kg док су бројлери контролне
5 групе остварили КК од 1,8 kg посматрано за цео период огледа.

7 **Резултати макроскопских и хистопатолошких испитивања (ЖП)**

9 **Макроскопске промене**

10 Код бројлера E-I групе који су храном добијали 0,1 mg АфБ₁/kg хране на
11 обдукцији је запажена појава жуте јетре трошне конзистенције и то код 4/12 животиња,
12 код 2/12 животиња у дуоденуму запажена су ситна једва видљива крварења. Код
13 бројлера E-II групе примећене су дискретне дисколорације на јетри код 3/12
14 испитиваних животиња. Код бројлера E-III и E-IV групе запажена је појава увећане јетре
15 са жутом пребојеношћу код 4/12 односно 3/12 испитиваних бројлера, као и
16 дисколорације на срцу код 1/12 испитиваних животиња. Код 4/12 бројлера E-V групе
17 примећена је жута пребојеност јетре и код једне животиње примећене су промене у
18 виду жућкастих наслага на језику. Жута пребојеност јетре која је била трошне
19 конзистенције примећена је код 2/12 животиња. Код бројлера контролне групе и МР
20 групе на обдукцији нису уочне макроскопске промене.

22 **Хистопатолошке промене у дуоденуму бројлера**

24 Код бројлера E-I групе који су храном добијали 0,1 mg АфБ₁/kg хране у
25 дуоденуму су забележене промене у виду хиперемии (6/12), хеморагија (7/12) као и
26 атрофија цревних ресица (12/12), уз повећање броја пехарастих ћелија цревних ресица
27 (10/12) и кариопикнозе у ћелијама Либеркинијевих крипти код 8/12 испитиваних
28 животиња.

29 Код бројлера групе E-II који су храном добијали 0,1 mg/kg АфБ₁ и 0,2%
30 испитиваног препарата МР у дуоденуму се запажају хиперемии, хеморагије и
31 повећање броја пехарастих ћелија цревних ресица. Крвављења у дуоденуму била су
32 детектована код 16,66% док је повећање броја пехарастих ћелија детектовано код
33 33,3% испитиваних животиња. Кариопикноза ћелија у Либеркинијевим криптама није
34 била забележена код бројлера ове групе. Можемо претпоставити да је мања
35 заступљеност и интензитет ХП промена код бројлера ове групе у односу на E-I групу
36 последица делимичног протективног дејства испитиваног препарата за детоксикацију
37 микотоксина.

38 Код бројлера E-III групе који су храном добијали 0,5 mg Т-2 токсина/kg хране. ХП
39 прегледом запажене су промене у дуоденуму бројлера у виду хиперемии (11/12),
40 хеморагија (3/12) и атрофија ћелија мукозе (8/12).

41 Код бројлера E-IV групе који су храном осим Т-2 токсина добијали и 0,2%
42 испитиваног препарата МР, хиперемии у дуоденуму забележена је код 41,6% а
43 атрофија цревних ресица код 33,3 % испитиваних животиња у односу на E-III групу
44 бројлера. Хистопатолошке промене су уочене код мањег броја животиња, док неке као
45 што је кариопикноза у ћелијама Либеркинијевих криптама нису детектоване.

46 У дуоденуму бројлера E-V групе запажене су следеће промене: хиперемии
47 (6/11), хеморагије (5/11), атрофија мукозе цревних ресица (9/11), повећање броја
48 пехарастих ћелија (6/11) као и кариопикноза у ћелијама Либеркинијевих крипти код 8/11
49 испитиваних животиња. Код бројлера E-VI групе који су храном поред АфБ₁ и Т-2
50 токсина добијали и испитивани препарат МР забележене су исте промене, с тим што су
51 детектоване код мањег броја животиња. Такође, промене су биле слабијег интензитета
52 у односу на ХП промене код бројлера E-V групе. Код бројлера К и МР групе нису
53 описане ХП промене у дуоденуму.

54 **Хистопатолошке промене у јетри бројлера**

55 У хепатоцитима бројлера E-I групе која је храном добијала 0,1 mg/kg АфБ₁
56 запажене су промене у виду мутног бубрења (5/12), вакуоларне дегенерације (9/12) и
57 некрозе (3/12), такође, је у жучним каналима детектована хиперплазија (6/12)
58 десквамативни холангитис (8/12) и перихолангитис (3/12) док је у интерстицијуму јетре
59 забележена перипортална фиброза код 3/12 испитиваних животиња.

1 У хепатоцитима бројлера Е-II групе који су храном добијали 0,1 mg/kg АфБ₁ уз
2 додаток 0,2% испитиваног препарата МР, запажене су промене у виду мутног бубрења,
3 вакуоларне дегенерације и некрозе, такође је у жучним каналима запажен
4 десквамативни холангитис и перихолангитис. Мутно бубрење детектовано је код
5 16,66% а вакуоларна дегенерација хепатоцита код 50% испитиваних животиња у односу
6 на бројлере Е-I групе. Остале промене у хепатоцитима и жучним каналима биле су
7 скоро једнако заступљене код бројлера Е-I и Е-II групе. Мања заступљеност неких ХП
8 промена детектованих у јетри може се приписати заштитном деловању испитиваног
9 препарата МР.

10 Код бројлера Е-III огледне групе у хепатоцитима жртвованих животиња
11 забележено је мутно бубрење (10/12), вакуоларна дегенерација (5/12), хидропсна
12 дегенерација (6/12) и некроза (7/12). Епител жучних каналића био је захваћен
13 променама као што су хипертрофија (6/12), дескваматорни холангитис (7/12) и
14 перихолангитис код 2/12 испитиваних животиња. У интерстицијуму јетре детектована је
15 перипортална фиброза код једне животиње.

16 Код бројлера Е-IV групе који су уз Т-2 токсин добијали и испитивани препарат
17 МР, ХП промене у јетри биле су заступљене код мањег броја животиња а неке од њих
18 (мутно бубрење и перипортална фиброза) нису биле детектоване код бројлера ове
19 групе. Хидропсна дегенерација хепатоцита (8,3%), некроза (33,3%), десквамативни
20 холангитис (33,3%) и интерстицијална инфилтрација моноклеарним ћелијама (50%)
21 биле су заступљене код мањег броја животиња у односу на бројлере Е-III групе.
22 Васкуларна дегенерација крвних судова јетре детектована је код само једне јединке ове
23 групе. Смањена заступљеност ХП промена или њихов изостанак у јетри бројлера Е-IV
24 групе може да укаже на позитивне ефекте додатог препарата за детоксикацију
25 микотоксина МР.

26 Код бројлера Е-V групе који су храном добијали 0,1 mg/kg АфБ₁ и 0,5 mg/kg Т-2
27 токсина у јетри, жучним каналима и интерстицијуму детектоване су бројне промене у
28 виду мутног бубрења (7/11), вакуоларне дегенерације (7/11), некрозе (2/11),
29 хиперплазије жучних канала (7/11), десквамативног холангитиса (9/11),
30 перихолангитиса (6/11), интерстицијалне перипорталне фиброзе код (2/11)
31 испитиваних животиња,

32 У хепатоцитима бројлера Е-VI групе који су храном добијали 0,1 mg/kg АфБ₁ и
33 0,5 mg/kg Т-2 токсина уз додаток 0,2% испитиваног препарата МР запажене су промене
34 у виду мутног бубрења, вакуоларне дегенерације и некрозе, такође је у жучним
35 каналима запажен десквамативни холангитис и перихолангитис. Мутно бубрење
36 детектовано је код 41,66% а вакуоларна дегенерација хепатоцита само код једне
37 јединке у односу на бројлере Е-V групе. Остале промене у хепатоцитима и жучним
38 каналима биле су скоро једнако заступљене код бројлера Е-V и Е-VI групе. Мања
39 заступљеност неких патохистолошких промена детектованих у јетри ове група бројлера
40 може се приписати заштитном деловању испитиваног препарата за детоксикацију
41 микотоксина.

42 Код бројлера К и МР групе нису описане ХП промене у јетри испитиваних животиња.

43 **Хистопатолошке промене у срцу бројлера**

44 У ћелијама срчаног мишића бројлера Е-I групе који су храном добијали 0,1
45 mg/kg АфБ₁ запажене су дегенерација (11/12), инфилтрација кардиомицита
46 моноклеарима (4/12) и хеморагије код 6/12 испитиваних животиња.

47 Код бројлера Е-II групе која је уз АфБ₁ добијала и испитивани препарат
48 дегенерација кардиомицита била је забележена код 50% испитиваних животиња у
49 односу на бројлере Е-I групе, док су остале промене биле сличне учесталости у односу
50 на бројлере Е-I групе.

51 Код бројлера Е-III групе који су храном добијали 0,5 mg/kg Т-2 токсина у
52 кардиомицитима описане су следеће промене: дегенерација (9/12), инфилтрација
53 моноклеарних ћелија (9/12) и крвављења у интерстицијуму миокарда код 6/12
54 испитиваних животиња.

55 Код бројлера Е-IV групе који су уз Т-2 токсин добијале и 0,2% МР препарата
56 промене у срчаном мишићу биле су заступљене код мањег броја животиња у односу на
57 бројлере Е-III групе. Забележени су интерстицијална инфилтрација моноклеарних

1 ћелија код 25% а крвављења у интерстицијуму миокарда код 50% испитиваних
2 животиња ове групе.

3 Код бројлера E-V групе који су храном добијали 0,1 mg/kg АфБ₁ и 0,5 mg/kg T-2
4 токсина у кардиомицитима описане су следеће промене: дегенерација (10/11),
5 инфилтрација монуклеарних ћелија (5/11) и крвављења у интерстицијуму миокарда код
6 4/11 испитиваних животиња.

7 Код бројлера E-VI групе који су храном поред АфБ₁ и T-2 токсина добијали и
8 испитивани препарат МР, ХП промене у срчаном мишићу биле су заступљене код
9 мањег броја испитиваних животиња у односу на бројлере E-V групе, и то
10 интерстицијална инфилтрација мононуклеарних ћелија код 25% а крвављења у
11 интерстицијуму миокарда код 30% бројлера ове групе. Код бројлера К и МР групе нису
12 описане ХП промене у срцу испитиваних животиња.

13 **Хистопатолошка испитивања у *Bursa fabricii* бројлера**

14 Код бројлера E-I огледне групе, која је храном добијала 0,1 mg/kg АфБ₁ у
15 ћелијама лимфних фоликула *Bursa fabricii* запажене су некроза (7/12) и апоптоза код
16 9/12 испитиваних животиња. Ове промене забележене су и код бројлера E-II огледне
17 групе која је уз 0,1 mg/kg АфБ₁ добијала и испитивани препарат МР. Некротичне
18 промене у лимфним фоликулима *Bursa fabricii* забележене су само код 8,3%
19 испитиваних животиња у односу на E-I групу, док је апоптоза у лимфним фоликулима
20 забележене код 55% испитиваних животиња ове групе.

21 У лимфним фоликулима *Bursa fabricii* код бројлера E-III групе који су храном
22 добијали 0,5 mg/kg T-2 токсина описане су промене у виду некрозе (12/12) и апоптозе
23 код 6/12 испитиваних животиња.

24 Код бројлера E-IV групе који су храном добијали 0,5 mg/kg T-2 токсина уз
25 додаток испитиваног препарата МР некроза у ћелијама *Bursa fabricii* описана је код
26 50% испитиваних животиња.

27 Код бројлера E-V огледне групе која је храном добијала 0,1 mg/kg АфБ₁ и 0,5
28 mg/kg T-2 токсина у ћелијама лимфних фоликула *Bursa fabricii* запажене су некроза
29 (2/12) и апоптоза, код свих животиња ове огледне групе. Исте промене забележене су и
30 код бројлера E-VI огледне групе која је храном добијала 0,1 mg АфБ₁/kg и 0,5 mg T-2
31 токсина/kg хране, уз додаток испитиваног МР препарата. Апоптоза у ћелијама *Bursa*
32 *fabricii* описана је код 50% испитиваних животиња ове групе.

34 **Испитивање садржаја резидуа АфБ₁, T-2 токсина и њихових метаболита (АфМ₁, 35 ХТ-2 токсин, T-2 триол и T-2 тетраол) у грудној мускулатури и јетри испитиваних 36 бројлера**

38 Анализа присуства АфБ₁ и T-2 токсина као и њихових метаболита (АфМ₁, ХТ-2
39 токсин, T-2 триол и T-2 тетраол) у ткивима бројлера (грудна мускулатура и јетра)
40 урађена је техником течне хроматографије купловане са масеном спектрометријом
41 (Agilent 6460c LC-MS/MS). Аналитичка метода испитивања је развијена и валидована у
42 лабораторији Patent Co, Лимит квантификације методе (LOQ) за АфБ₁, износи 0,1 µg/kg,
43 за T-2 токсин износи 0,2 µg/kg. Изотопско обележени интерни стандарди микотоксина,
44 који су коришћени у методи, за кориговање утицаја матрикса су били (13C 24) АфБ₁
45 CRM BiopureTM-(0,5 µg/ml) за одређивање афлатоксина и (13C 24) T-2 токсина CRM
46 BiopureTM-(25 µg/ml) за одређивање T-2 токсина. Тачност аналитичке методе
47 (Recovery, %) је >75% за сваки испитивани аналит. Метода одређивања је била
48 линеарна у опсегу од 0,1 до 1,2 µg/kg за АфБ₁ и АфМ₁ и од 0,2 до 4,0 µg/kg за T 2
49 токсин.

50 Резултати испитивања показују да су бројлери храњени са 0,1 mg АфБ₁/kg хране имали
51 просечну концентрацију АфБ₁ у јетри од 0,235 µg/kg. Група бројлера (E-II) која је уз 0,1
52 mg АфБ₁/kg хране добијала и 0,2% препарата МР имала је за 51,06% нижу
53 концентрацију АфБ₁ у јетри (0,12 µg/kg) у односу на E-I групу, забележена је статистички
54 значајна разлика на нивоу P<0,01.

55 Код бројера E-V и E-VI групе нису детектовани остаци АфБ₁ у јетри и грудној
56 мускулатури. Предпоставља се да је разлог то што су обе ове групе бројлера
57 конзумирале ниже количине контаминиране хране у односу на бројлере E-I и E-II групе.
58 Код бројлера E-III, E-IV, E-V и E-VI, групе нису детектовани остаци T-2 токсина, ХТ-2

1 токсина као и Т-2 триола и Т-2 тетраола у испитиваним ткивима. Разлог је јако брзо
2 метаболисање Т-2 токсина, за мање од 24 сата од уношења у организам.

3 АфМ₁, метаболит АфБ₁ се ствара у јетри у процесу његове биотрансформације,
4 пошто је растворљив у води (код млечних животиња се излучује путем млека и урина).
5 Код животиња које не луче млеко може се наћу у јетри и урину као метаболит. АфМ₁
6 није детектован у јетри испитиваних бројлера.

7 Метаболити Т-2 токсина, ХТ-2 токсин, Т-2 триол и Т-2 тетраол нису детектовани
8 у јетри и грудној мускулатури испитиваних бројлера.
9

10 У поглављу “Дискусија” кандидат критички разматра добијене резултате и пореди их са
11 резултатима других аутора.

12
13 У поглављу “Списак литературе” наведено је 236 референци.
14

15 **ЗАКЉУЧЦИ ИСТРАЖИВАЊА (навести закључке који су приказани у докторској**
16 **дисертацији):**

17 **ЗАКЉУЧЦИ**

- 18 1. АфБ₁ додаван у храну бројлера у концентрацији од 0,1 mg/kg током 42 дана
19 испољио је негативан утицај на њихову телесну масу, прираст, конзумацију
20 хране и коефицијент конверзије.
21
22
- 23 2. Примена препарата за детоксикацију микотоксина у храни бројлера (0,2%), а у
24 коју је додаван и АфБ₁ у концентрацији од 0,1 mg/kg, имала је за последицу
25 вишу телесну масу третираних бројлера за 12,5% и нижи КК за 4,55% у односу
26 на бројлере који су храном добијали само АфБ₁. Међутим, иако су код ових
27 бројлера забележени бољи производни резултати, који се могу приписати
28 присуству детоксификатора у храни, до краја огледа сви негативни ефекти АфБ₁
29 нису неутралисани.
30
- 31 3. Код бројлера који су током целог огледа храном добијали 0,1 mg/kg АфБ₁
32 детектоване су хистопатолошке промене у дуоденуму, јетри, срцу и *Bursa*
33 *fabricii*. Исте хистопатолошке промене у органима детектоване су и код бројлера
34 који су уз АфБ₁ храном добијали и детоксификатор, међутим промене су
35 доказане код мањег броја птица и интезитет промена је био слабији док су неке
36 изостале.
37
- 38 4. Код бројлера који су храном добијали 0,1 mg/kg АфБ₁ детектоване су његове
39 резидуе у јетри и то у концентрацији од 0,235 µg/kg. Код бројлера, који су уз 0,1
40 mg/kg АфБ₁ добијали и 0,2% детоксификатора, детектоване су резидуе АфБ₁ у
41 јетри у концентрацији од 0,12 µg/kg што је за 51,06% ниже у односу на бројлере
42 који храном нису добијали детоксификатор. Резидуе АфБ₁ нису детектоване у
43 грудној мускулатури бројлера обе групе. Такође, у јетри нису детектоване
44 резидуе АфМ₁ (метаболита АфБ₁) код бројлера обе групе.
45
- 46 5. Т-2 токсин додаван у храну бројлера у концентрацији од 0,5 mg/kg током 42
47 дана испољио је негативан утицај на телесну масу, прираст, конзумацију и
48 коефицијент конверзије.
49
- 50 6. Бројлери који су храном уз 0,5 mg/kg Т-2 токсина добијали и 0,2% препарата за
51 детоксикацију имали су на крају огледа за 12,36 % више телесне масе и 4,55%
52 нижи коефицијент конверзије у односу на бројлере који су храном добијали само
53 Т-2 токсин. Иако су бројлери ове групе имали боље производне резултате у
54 односу на бројлере који су добијали храном Т-2 токсин, до краја огледа није
55 дошло до потпуног неутралисања негативних ефеката Т-2 токсина на
56 производне резултате. То значи да је испитивани детоксификатор остварио
57 делимично протективно дејство у односу на Т-2 токсин.
58

- 1 7. Код бројлера који су током целог огледа храном добијали 0,5 mg/kg T-2 токсина
2 детектоване су хистопатолошке промене у дуоденуму, јетри, срцу и *Bursa*
3 *fabricii*. Код бројлера који су током огледа храном добијали 0,5 mg/kg T-2 токсина
4 и 0,2% детоксификатора, хистопатолошке промене су такође доказане у свим
5 органима. Међутим, код бројлера ове групе, хистопатолошке промене су
6 забележене код мањег броја животиња и биле су слабијег интензитета док су
7 неке изостале. Можемо закључити да је детоксификатор остварио делимичну
8 заштиту код испитиваних животиња.
9
- 10 8. Код бројлера који су храном добијали 0,5 mg T-2 токсина/kg хране, као и T-2
11 токсин и 0,2% детоксификатора микотоксина у јетри и грудној мускулатури нису
12 детектоване резидуе T-2 и ХТ-2 токсина, као и T-2 триола и T-2 тетраола.
13 Разлог је највероватније интезивна биотрансформација T-2 токсина и брза
14 елиминација његових метаболита из организма након уношења.
15
- 16 9. Код бројлера који су током огледа храном добијали 0,1 mg/kg АфБ₁ и 0,5 mg/kg
17 T-2 токсина забележен је негативан утицај оба токсина на телесну масу,
18 прираст, конзумацију и коефицијент конверзије. Бројлери ове групе имали су
19 најниже телесне масе на крају огледа у односу на све друге огледне групе које
20 су добијале токсине појединачно или ову комбинацију токсина уз додатак
21 детоксификатора. Из овога се може закључити да је у питању синергистички
22 негативан ефекат два микотоксина. Третирани бројлери конзумирали су за
23 11,66% и 11,82% мање хране током целог огледа у односу на групе бројлера
24 које су добијале појединачне дозе АфБ₁ и T-2 токсина.
25
- 26 10. Бројлери који су храном уз 0,1 mg/kg АфБ₁ и 0,5 mg/kg T-2 токсина добијали и
27 0,2% препарата за детоксикацију микотоксина имали су само 2,88% више
28 просечне ТМ у односу на бројлере Е-V групе (без детоксификатора). Можемо
29 закључити да је услед негативног синергистичког дејства два микотоксина
30 дошло до смањене конзумације хране, што је довело до значајног пада
31 производних резултата. Истовремено због уношења мање количине токсина
32 није дошло до потпуне експресије штетних ефеката оба микотоксина.
33
- 34 11. Код бројлера који су током целог огледа храном добијали 0,1 mg АфБ₁ и 0,5 mg
35 T-2 токсина/kg хране детектоване су хистопатолошке промене у дуоденуму,
36 јетри, срцу и *Bursa fabricii*. Бројлери ове групе имали су хистопатолошке
37 промене заступљене код највећег броја животиња. Код бројлера групе који су
38 током целог огледа храном добијали 0,1 mg АфБ₁ и 0,5 mg/T-2 токсина и 0,2%
39 препарата за детоксикацију детектоване су такође исте хистопатолошке
40 промене у свим органима. Међутим, код бројлера ове групе, хистопатолошке
41 промене промене су забележене код мањег броја птица и биле су слабијег
42 интензитета док су неке потпуно изостале. Можемо сматрати да је
43 детоксификатор микотоксина остварио делимичну заштиту од истовременог
44 штетног дејства два микотоксина код испитиваних животиња.
45
- 46 12. У јетри и грудној мускулатури бројлера који су храном добијали АфБ₁ и T-2
47 токсин, као и комбинацију ова два токсина и 0,2% детоксификатора
48 микотоксина, нису детектоване резидуе АфБ₁, АфМ₁, T-2 и ХТ-2 токсина, као и
49 T-2 триола и T-2 тетраола. Разлог је највероватније смањена конзумација
50 хране, а самим тим и мање уношење токсина.
51
52
53

54 **VII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА (навести**
55 **да ли су добијени резултати у складу са постављеним циљем и задацима**
56 **истраживања, као и да ли закључци произилазе из добијених резултата):**
57
58

59 Добијени резултати су приказани у виду, слика, табела и графикона и на основу тога
60 правилно и критички тумачени. Текст је написан концизно, јасним и разумљивим

1 стилем. Комисија сматра да су добијени резултати испитивања у складу са
2 постављеним циљем и задацима истраживања и да закључци ове докторске
3 дисертације произилазе из добијених резултата.

6 VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

7
8 1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави
9 теме?

10 Докторска дисертација кандидата Дарка Стефановића под насловом:
11 „Испитивање ефикасности вишеккомпонентног препарата за детоксикацију у
12 превенирању штетних ефеката афлатоксина Б₁ и Т-2 токсина додатих у храну
13 бројлера“ је написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

14
15 2. Да ли дисертација садржи све елементе прописане за завршену докторску
16 дисертацију?

17 Дисертација садржи све битне елементе који су неопходни за завршену
18 докторску дисертацију.

19
20 3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?

21 Докторска дисертација кандидата Дарка Стефановића „Испитивање
22 ефикасности вишеккомпонентног препарата за детоксикацију у превенирању штетних
23 ефеката афлатоксина Б₁ и Т-2 токсина додатих у храну бројлера“ представља
24 оригиналан допринос научним истраживањима. Добијени резултати указују да
25 додавање мултикомпонентних препарата за детоксикацију микотоксина чине корак у
26 напред у односу на до сада коришћење адсорбенте микотоксина, пре свега због
27 додатака који могу да изврше биодеградацију и биотрансформацију микотоксина до
28 мање токсичних једињења. Ови препарати делимично утичу на поправљање
29 производних резултата и репарацију промена у захваћеним органима, али имају
30 могућност да значајно смање или у потпуности неутралишу појаву остатака
31 микотоксина и њихових метаболита у јестивим ткивима и намирницама анималног
32 порекла. Ово је веома важно са аспекта безбедности хране и спречавања уласка
33 микотоксина у ланац хране. Такође је запажено да је група бројлера храњена
34 комерцијалном смешом уз додатак 0,2% детоксификатора микотоксина остварила
35 најбоље производне резултате, што може да укаже на позитивне ефекте пробиотских
36 култура и фикофитних материја из препарата на здравље гастронинтестиналног тракта
37 бројлера.

38
39 4. Да ли је ментор током провере оригиналности дисертације утврдио
40 неоправдано преклапање текста са другим публикацијама (одговорити са да или
41 не): НЕ

42
43 IX СПИСАК НАУЧНИХ РАДОВА САДРЖИНСКИ ПОВЕЗАНИХ СА ДОКТОРСКОМ
44 ДИСЕРТАЦИЈОМ У КОЈИМА ЈЕ ДОКТОРАНД ПРВИ АУТОР ОДНОСНО АУТОР СА
45 НЕЈВЕЋИМ ДОПРИНОСОМ (написати имена свих аутора, годину објављивања,
46 наслов рада, назив часописа, импакт фактор и класификацију према Правилнику
47 о поступку, начину вредновања и квантитативном исказивању
48 научноистраживачких резултата истраживача):

49
50 Рад у међународном часопису M22:

51
52 Darko Stefanović, Darko Marinković, Saša Trailović, Marko Vasiljević, Hunor Farkaš, Jog Raj,
53 Nataša Tolimir, Stamen Radulović, Vladimir Nešić, Jelena Nedeljković Trailović,* and Branko
54 Petrujkić, Evaluation of Effectiveness of a Novel Multicomponent Mycotoxins Detoxification
55 Agent in the Presence of AFB₁ and T-2 Toxin on Broiler Chicks, Microorganisms 2023, 11,
56 574. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030574>

57
58
59 X ПРЕДЛОГ:
60

1 **На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже (одабрати једну од**
2 **три понуђених могућности):**

3 **- да се докторска дисертација прихвати а кандидату одобри одбрана**

4 - да се докторска дисертација врати кандидату на дораду

5 - да се докторска дисертација одбије

17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

Чланови комисије:

У Београду 08.11.2024. год.

др Јелена Недељковић Траиловић, редовни професор
ментор-1

Факултет ветеринарске медицине

др Мирјана Миловановић, ванредни професор
ментор -2

Факултет ветеринарске медицине

др Дарко Маринковић, редовни професор
Факултет ветеринарске медицине

др Драгољуб Јовановић, виши научни сарадник
Факултет ветеринарске медицине

др Срђан Стефановић, научни сарадник
Институт за хигијену и технологију меса,
Београд.
