

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE
KATEDRA ZA FIZIOLOGIJU I BIOHEMIJU

Mlinar V. Saša, dr vet. med.

**UTICAJ VISOKE DOZE C VITAMINA NA
FUNKCIJE NEUTROFILNIH GRANULOCITA
VISOKO-MLEČNIH KRAVA SA
SUPKLINIČKIM MASTITISIMA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2016. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY

Mlinar Saša, dr vet. med.

**THE INFLUENCE OF HIGH VITAMINE C
DOSES ON NEUTROPHIL
GRANULOCYTES FUNCTIONS IN COWS
WITH SUBCLINICAL MASITIS**

DOCTORAL THESIS

Belgrade, 2016

MENTOR:

Dr Miodrag Lazarević, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Dr Slobodanka Vakanjac, vanredni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

2. Dr Aleksandar Milovanović, naučni saradnik, NIV "Novi Sad", Novi Sad

3. Dr Aleksandar Stanojković, naučni saradnik, Institut za stočarstvo, Beograd

4. Dr Igor Stojanov, viši naučni saradnik, NIV "Novi Sad", Novi Sad

Datum odbrane:

Beograd

ZAHVALNOST

Zahvaljujem se svom mentoru, prof. dr Miodragu Lazareviću, na nesebičnoj pomoći i strpljenju, posebno tokom finalizacije ove disertacije.

Puno se zahvaljujem dr Srđanu Markoviću i dr Dejanu Vučkoviću na tehničkoj podršci neophodnoj za izvođenje samog eksperimenta.

Posebnu zahvalnost dugujem kolegama dr Aleksandru Milovanoviću i dr Aleksandru Stanojkoviću, bez čije pomoći ne bi bilo moguće realizovati ovaj rad.

Takođe se zahvaljujem i svim ostalim kolegama i prijateljima koji su tokom izrade ovog rada svojim sugestijama i savetima pomagali da se rad oblikuje i dobije ovu završnu formu.

Zahvaljujem se svojoj supruzi, deci i roditeljima, koji su verovali u mene, pružali mi neograničenu podršku uz ogromno strpljenje, koje su samo oni mogli da mi pruže.

Posvećeno mojoj deci!

UTICAJ VISOKE DOZE C VITAMINA NA FUNKCIJE NEUTROFILNIH GRANULOCITA VISOKO-MLEČNIH KRAVA SA SUPKLINIČKIM MASTITISIMA

Rezime

Napredak tehnologije i direktna primena najnovijih naučnih saznanja omogućili su, do sada, najvišu produkciju mleka po kravi u farmskim uslovima. Usled intenzivne i jednostrane selekcije na visoku mlečnost, došlo se do granica biološkog potencijala ove životinjske vrste. Imperativ povećanja proizvodnje (odnosno profita), gde se u velikom broju slučajeva, krave iscrpljuju do krajnjih fizioloških granica, nanosi štetu njihovom zdravstvenom stanju uz zanemarivanje osnovnih bioloških principa. Visoko-mlečne krave se uvode u stanje kontinuiranog metaboličkog stresa, koji neminovno rezultira zdravstvenim i proizvodnim problemima.

Indirektno se, kao posledica narušavanja imunološkog statusa jedinki, pojavljuje najvažniji zdravstveni i ekonomski problem u mlečnom govedarstvu, a to je upala mlečne žlezde - mastitis. Štete u vidu smanjene proizvodnje čine preko 70% svih gubitaka produkcije mleka, dok lečenje mastitisa čini preko 50% svih intervencija na farmama mlečnih krava. Posebno treba naglasiti činjenicu da se najveći deo problema u realnim uslovima proizvodnje odnosi na supkliničke mastitise, koji nisu direktno vidljivi i oni dovode do najvećih finansijskih gubitaka. Zbog toga su farme bez adekvatnog programa mera kontrole i suzbijanja supkliničkog mastitisa, zapati sa ugroženim opstankom.

Smatra se da se fiziološke potrebe odraslih preživara u vitaminu C obezbeđuju aktivnošću bakterijske mikroflore buraga. Vitamin C nije esencijalan dijetalni dodatak u ishrani odraslih preživara. Međutim, istovremeno je dokazano da se zdravstveno stanje organizma preživara poboljšava kada se vitamin C dodaje u hranu u uslovima stresa ili bolesti. Takođe je poznato da oralna aplikacija nije toliko efikasna kao parenteralna. Rana laktacija predstavlja najkritičniji period reproduktivno-proizvodnog ciklusa, kada se mobilišu gotovo svi raspoloživi fiziološki resursi i tada dolazi do pada koncentracije askorbinske kiseline u krvnoj plazmi mlečnih krava. Istovremeno se od mlečnih krava očekuje oporavak od teljenja, postizanje vrhunске mlečnosti i novog graviditeta u što kraćem vremenskom periodu. Postoje podaci koji dokazuju da je i tokom supkliničkog, a pogotovo kliničkog mastitisa izražen pad koncentracije vitamina C u krvnoj plazmi plotkinja. Shodno tome, osnova ovog istraživanja je bila zasnovana na pretpostavci da se poboljšanje opšte otpornosti organizma stimulacijom funkcija neutrofilnih granulocita (stepena fagocitoze i respiratornog praska) kao prve linije odbrane od infekcija, može postići produženom aplikacijom visokih doza vitamina C, višestruko većim od farmakološki preporučenih. Klinički su očekivani pozitivni efekti na smanjenje broja somatskih ćelija u mleku i poboljšanje ukupnog zdravstvenog i reproduktivnog statusa. Sa druge strane, ne postoje dostupni podaci o toksičnosti vitamina C kod preživara prekomernim doziranjem.

Ciljevi ovog istraživanja su bili da se utvrdi uticaj visokih doza vitamina C na kvalitet mleka ocenjen CMT (*California Mastitis Test*), 10 do 30 dana posle teljenja, pre i nakon tretmana vitaminom C (tretirana grupa), odnosno, na početku i na kraju oglada u kontrolnoj grupi (bez tretmana). Osim toga ispitan je bakteriološki nalaz mleka iz CMT pozitivnih četvrti na početku i na kraju oglada, u zavisnosti od tretmana vitaminom C. Kod svih jedinki, uključenih u ogled određivane su kompletna krvna slika i leukogram, pre i nakon tretmana vitaminom C. Na kraju je utvrđivan stepen funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita (intenzitet fagocitoze i respiratornog praska) u punoj krvi i mleku krava u navedenom periodu.

U ispitivanju je bilo uključeno 40 grla, odabranih prema sledećim kriterijumima: 1) da je od teljenja prošlo najmanje 10 a ne više od 30 dana; 2) da je na jutarnjoj muži mleko krava ispoljavalo pozitivnu reakciju u CMT (sa ++ i +++ reakcijom) u jednoj ili više četvrti, bez klinički vidljivog

mastitisa; 3) da je zapis toka teljenja bio normalan, bez dodatne asistencije akušera; 4) da su odabrane krave klinički bile zdrave.

Uzorci mleka iz CMT pozitivnih četvrti su uzimani radi mikrobiološke analize. Na osnovu tih rezultata, formirane su ogledna grupa (N=30) i kontrolna grupa (N=10). Aplikacija vitamina C je vršena supkutano, jednom dnevno, tokom 5 dana, u dozi od 25 mg/kg, injekcionim preparatom "Vitamin C" (VZ Subotica, R. Srbija).

Prvog dana ogleda (početak aplikacije vitamina C), pre jutarnje muže, od svakog grla je uziman zbirni uzorak mleka iz CMT pozitivnih četvrti, a zatim posle muže i uzorak pune krvi iz *v. iugularis* u vakutejner sa heparinom radi određivanja kvantitativno-kvalitativnog testa fagocitne sposobnosti i respiratornog praska neutrofilnih granulocita i monocita krvi i mleka. Test je izvođen protočnom citometrijom, komercijalnim testovima "Fagotest" i "Fagoburst" (Glykotype Biotechnology GmbH, Heidelberg, Nemačka). Drugi uzorak pune krvi iz *v. iugularis* je uziman u vakutejner epruvete sa EDTA radi hematoloških analiza. Sedmog dana od početka petodnevne aplikacije vitamina C (2. dan od završetka tretmana), ponovljeno je uzorkovanje i vršene su iste analize kod svih grla. Tada su ponovo uzimani uzorci mleka od svih grla u eksperimentu iz svih CMT pozitivnih četvrti sa početka eksperimenta radi dalje mikrobiološke analize.

Sedmog dana, nakon početka petodnevne aplikacije visokih doza vitamina C, došlo je do izostanka CMT pozitivne reakcije mleka kod 66,67% tretiranih krava u fazi rane laktacije. Međutim, nije dokazana jasna korelacija rezultata bakteriološke pretrage mleka sa tretmanom C vitaminom.

Tretman visokim dozama vitamina C nije dovodio do promena u broju eritrocita, koncentraciji hemoglobina, hematokritskoj vrednosti i izvedenih parametara crvene krvne slike. Ukupan broj leukocita, broj granulocita i limfocita kao i njihov odnos nije se menjao u zavisnosti od tretmana vitaminom C. Povišen broj granulocita registrovan je kod CMT pozitivnih grla u ranoj laktaciji.

Tretman vitaminom C je imao pozitivan i snažan uticaj na fagocitozu neutrofilnih granulocita i monocita krvi. Procenat aktiviranih ćelija u procesu fagocitoze, kao i intenzitet fagocitoze (MFI) nakon tretmana vitaminom C statistički je bio visoko značajno veći ($p < 0,001$). Pozitivni efekti su zabeleženi i kod neutrofilnih granulocita mleka, ali je detektovana fagocitna sposobnost bila niskog intenziteta nakon migracije iz krvotoka u lumen mlečne žlezde ($< 5\%$ aktivnih ćelija; $p < 0,05$). Procenat neutrofilnih granulocita krvi koji su izvršili respiratorni prasak statistički je viši ($p < 0,05$) u grupi krava tretiranih vitaminom C, dok je prosečan intenzitet njihove fluorescencije (MFI, kao indikator snage ROS reakcije) samo numerički viši u krvi i mleku. Visoke doze vitamina C smanjivale su vrednosti parametara respiratornog praska monocita krvi ali bez statističke značajnosti. Proces stvaranja reaktivnih oksida u neutrofilnim granulocitima i monocitima mleka i intenzitet respiratornog praska je bio sličan kao u krvi (visok), ali bez statističkih značajnosti razlika između grupa na početku i kraju ogleda.

Terapija supkliničkih mastitisa povišenim dozama vitamina C može biti prihvatljiva alternantiva ili potpora antibiotskoj terapiji. Potrebno je razmotriti modifikaciju (smanjenje) doze vitamina C kako bi se izbegao eventualni inhibitorni efekat previsokih doze askorbinske kiseline na respiratorni prasak. Izostanak očekivanog povećanja respiratornog praska je pogotovo evidentan kod monocita koji se fiziološki odlikuju dvostuko većom akumulacijom C vitamina u odnosu na PMNL.

Ključne reči: fagocitoza, neutrofilni granulociti, respiratorni prasak, supklinički mastitis, vitamin C.

Naučna oblast	Veterinarska medicina
Uža naučna oblast	Reprodukcija domaćih životinja
UDC	619:591.111.7:618.19-002

THE INFLUENCE OF HIGH VITAMIN C DOSES ON NEUTROPHIL GRANULOCYTES FUNCTIONS IN COWS WITH SUBCLINICAL MASITIS

Summary

Development of new technologies and direct application of the latest scientific findings enabled the highest milk production per cow ever in farm conditions. Due to the intense and narrow selection for high milk yield today, we approached the limits of the biological potential of this species. The imperative of increased production (or profit), where in a good number of cases cows are exhausted to the extreme physiological limits in order to achieve greater milk production, harming their health status and fully neglecting basic biological principles. In this way, we are introducing them into a state of continuous stress, which inevitably results in a wide range of health and/or production problems.

Indirectly, as a result of disturbance of the immune status, the most important health and economic problem within dairy cattle production, appears inflammation of the mammary gland - mastitis. The damage in terms of reduced milk production account for over 70% of all milk production losses, while treating mastitis comprise over 50% of all interventions on dairy farms. We should emphasize the fact that the biggest part of the problem in real production conditions is related to subclinical mastitis, which is not directly visible. The real fact is that subclinical mastitis brings the largest financial losses. A farm without adequate program of measures to control and combat subclinical mastitis doesn't have "bright" future.

It is believed that sufficient physiological needs of adult ruminants in vitamin C are provided by activity of the rumen bacterial microflora. Also, it is believed that vitamin C is not essential dietary nutrient in the diet of adult ruminants, but their body condition are improved when they had vitamin C added to the diet in situation of stress or illness. Also, oral application is not as effective as the parenteral route.

After calving, in its early phase of lactation there is a decrease in concentration of ascorbic acid (vitamin C) in the blood plasma of dairy cows. Early lactation represents the most critical period of reproductive-production cycle, when almost all available physiological resources are mobilized and pushed to the final limits. The dairy cows are expected to recover from calving, reaching soon the peak of lactation and a new pregnancy in the shortest possible time. The decrease in the concentration of vitamin C is expressed during subclinical, especially during clinical mastitis. Consequently, the platform of this research is based on the assumption that an improvement in the general resistance of the organism by stimulating the neutrophil granulocytes (phagocytosis and respiratory burst) as a first line of defence against infection can be achieved by prolonged application of high vitamin C doses, a multiple higher than the pharmacologically recommended. Clinically, the expected positive effects are the reduction of somatic cells in milk and improved overall health and reproductive status. On the other hand, there are no available data on the toxicity of vitamin C in ruminants excessive dosing. The main objectives of this study were: to determine the effect of high doses of vitamin C on the quality of milk, estimated with CMT test; 10 to 30 days after calving, before and after treatment with vitamin C (experimental group), respectively, at the beginning and end of the experiment in the control group (no treatment); to perform milk bacteriological examination of CMT positive udder quarters at the beginning and end of the trial, depending on the treatment of vitamin C; to determine complete blood count and leukogram in cows before and after the treatment with vitamin C; to determine degree of functional activity of neutrophil granulocytes (phagocytosis and respiratory burst) from whole blood and CMT positive milk samples (++, +++) in the related period (before and after the treatment).

Fourty cows has been selected, according to the following selection criteria: 1) from the calving has passed at least 10 days and not more than 30 days; 2) at the morning milking cows milk produced positive reaction to the CMT (with ++ and +++ reaction) from one or more udder quarters, without clinically apparent mastitis; 3) the calving was normal, without additional assistance of veterinarian; 4) selected cows had to be clinically healthy.

First of all, the milk samples from CMT positive quarters were collected and taken for further microbiological examination. Based on the CM test and microbiological results, we were able to form experimental group (N = 30) and control group (N = 10). Following previous step, regime of subcutaneous ascorbic acid application could be applied once daily for 5 days, at a dose of 25 mg / kg of BW (injectable "Vitamin C", VZ Subotica, R. Serbia).

On the first trial day (application of vitamin C), mixed milk samples from CMT positive quarters were taken from all selected cows and also the first samples of whole blood from jugular vein in vacutainer tubes containing heparin in order to perform quantitative and qualitative assay of phagocytic capacity and respiratory burst of neutrophil granulocytes and monocytes from the blood and milk. The test was performed by flow cytometry, with commercial tests "Phagotest" and "Phagoburst" (Glykotype Biotechnology GmbH, Heidelberg, Germany). A second sample of whole blood from jugular vein was taken in vacutainer tubes with EDTA to perform the haematological analysis and differential leukocytes count.

On the seventh day since the start of the five-day application of vitamin C (2nd day from the end), we repeated all above sampling procedures and analysis in the same way in all animals. Also, collection of the milk samples from all previously CMT positive udder quarters for microbiological examination was performed.

As a first visible result, CMT positive reactions were absent in milk samples of 66,67% of treated cows in early lactation. We were not able to document clear positive correlation between treatment by injectable vitamin C and improvement in microbiological results from milk.

Treatment with high vitamin C doses had no effect on the changes in the number of erythrocytes, haemoglobin concentration, haematocrit value and other parameters of red blood picture. The total leukocyte count, count of PMNL and lymphocytes as well as their relationships has not been changed after the vitamin C treatment. The elevated number of PMNL and leukogram in favour of PMNL indicated leukocytosis related to CMT positive cases in early lactation.

Treatment with vitamin C produced a clearly positive and powerful impact on phagocytosis of PMNL and monocytes from blood. The percentage of activated cells in the process of phagocytosis as well as phagocytosis intensity (MFI) after treatment with vitamin C was significantly higher ($p < 0.001$). Positive effects have been reported with PMNL from milk, but detected phagocytic capacity had low intensity after migration from the bloodstream into the lumen of the mammary gland ($< 5\%$ active cells, $p < 0.05$).

The percentage of PMNL blood who carried out respiratory burst was statistically higher ($p < 0.05$) in the group of cows treated with vitamin C, while the average of their fluorescence intensity (MFI, as an indicator of ROS reaction force) was only numerically higher in the blood and milk. High doses of vitamin C had a weaker suppressive effect on the parameters of the respiratory burst of monocytes from blood, but without statistical significance. The process of forming reactive oxygen species in PMNL and monocytes from milk and the intensity of the respiratory burst was similar to that in the blood (high), but with no statistically significant differences between groups at the beginning and at the end of the trial.

The treatment of subclinical mastitis with high doses of vitamin C may be acceptable alternative or aid to antibiotic therapy. It is necessary to consider modification (decrease) in doses of vitamin C in order to avoid inhibitory effect of too high doses of ascorbic acid to the respiratory burst. The absence of the expected increase in respiratory burst is especially evident in monocytes, the cells physiologically capable to reach almost double higher concentration of ascorbic acid compared to PMNL.

Key words: neutrophil granulocytes, phagocytosis, respiratory burst, subclinical mastitis, vitamin C

Scientific field
Specific scientific field
UDC

Veterinary medicine
Reproduction of domestic animals
619:591.111.7:618.19-002

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	7
2.1. Imunski sistem - odbrambeni mehanizam tela	7
2.1.1. Nespecifični (urođeni) i specifični (adaptivni) imunitet	8
2.2. Leukociti, uloga u nespecifičnom imunskom odgovoru	17
2.2.1. NK ćelije	18
2.2.2. Ćelije monocitno-makrofagnog sistema i mijeloidne dendritične ćelije	21
2.2.3. Polimorfonuklearni leukociti (granulociti)	33
2.2.3.1. Mastociti (labrociti, mast ćelije)	34
2.2.3.2. Bazofilni granulociti (bazofili)	38
2.2.3.3. Eozinofilni granulociti (eozinofili)	41
2.2.3.4. Neutrofilni granulociti	46
2.2.3.4.1. Generisanje neutrofilnih granulocita	48
2.2.3.4.2. Struktura i biohemija neutrofilnih granulocita	52
2.2.3.4.3. Migracija neutrofilnih granulocita iz krvnih sudova u tkiva	60
2.2.3.4.4. Fagocitoza	66
2.2.3.4.5. Oksidativni (respiratorni) prasak neutrofilnih granulocita	74
2.2.3.4.6. Vanćelijske neutrofilne mreže (neutrophil extracellular traps, NETs)	77
2.2.3.4.7. Mehanizmi rezistencije mikroorganizama na dejstvo neutrofilnih granulocita	83
2.2.3.4.8. Uloga neutrofilnih granulocita u odbrani mlečne žlezde	87
2.2.4. Leukociti goveda i leukocitna formula	92
2.3. Mastitisi krava - definicije, podela, dijagnostika i ekonomski aspekti	96
2.3.1. Morfologija mlečne žlezde	97
2.3.2. Definicije, etiološka i klinička podela mastitisa	99
2.3.2.1. Pojam i definicije mastitisa	99
2.3.2.2. Etiološka i klinička podela mastitisa	101
2.3.3. Dijagnostika mastitisa i ekonomski aspekti	108
2.3.3.1. Simptomi i dijagnostika mastitisa	108
2.3.3.2. Ekonomski aspekti pojave mastitisa	114
2.4. Mastitisi krava - prevencija i terapija	116
2.4.1. Širenje i prevencija mastitisa	116
2.4.2. Terapija mastitisa	120
2.4.2.1. Intramamarni preparati za životinje u toku perioda laktacije	123
2.4.2.2. Intramamarni preparati za životinje koje nisu u periodu laktacije	124
2.4.2.3. Preparati koji služe za zatvaranje kanala mlečne žlezde	125
2.4.2.4. Preparati za negu sisa i vimena	125
2.4.2.5. Uzroci neuspeha antibiotske terapije	127

2.5. Vitamin C (L-askorbinska kiselina)	128
2.5.1. <i>Biohemijski i biološki značaj vitamina C</i>	129
2.5.2. <i>Sinteza, hemijski sastav i fizičke osobine vitamina C</i>	130
2.5.3. <i>Izvori vitamina C</i>	134
2.5.3.1. <i>Prirodni izvori</i>	134
2.5.3.2. <i>Suplementi</i>	136
2.5.4. <i>Pregled ispitivanja uloge vitamina C u organizmu i ishrani domaćih životinja</i>	136
2.5.4.1. <i>Potrebe organizma za vitaminom C</i>	137
2.5.4.2. <i>Nedostatak vitamina C u organizmu</i>	141
2.5.4.3. <i>Potencijalna toksičnost vitamina C u organizmu</i>	145
2.5.5. <i>Pregled ispitivanja uloge vitamina C u imunitetu organizma domaćih životinja</i>	145
2.5.6. <i>Pregled ispitivanja uticaja nivoa vitamina C u krvi i mleku krava sa mastitisom</i>	146
2.5.7. <i>Pregled ispitivanja oksidativnog praska i uloge vitamina C u oksidativnom prasku</i>	150
2.5.7.1. <i>Pojam oksidativnog praska</i>	151
2.5.7.2. <i>Uloga vitamina C u oksidativnom prasku</i>	153
2.6. Protočna citometrija (Flow cytometry) u analizi funkcija neutrofilnih granulocita	154
3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA	157
4. MATERIJAL I METODE RADA	159
4.1. <i>Ogledne životinje</i>	159
4.1.1. <i>Opšti podaci</i>	159
4.1.2. <i>Selekcija oglednih grla</i>	159
4.2. <i>Faze eksperimenta</i>	160
4.2.1. <i>Terapija injekcionim preparatom vitamina C</i>	162
4.3. <i>Uzorkovanje materijala za laboratorijske analize</i>	162
4.3.1. <i>Uzorkovanje krvi</i>	162
4.3.2. <i>Uzorkovanje mleka</i>	163
4.3.2.1. <i>Uzorkovanje mleka za mikrobiološku analizu i određivanje broja somatskih ćelija</i>	163
4.3.2.2. <i>Uzorkovanje mleka za utvrđivanje fagocitne sposobnosti i respiratornog praska</i>	163
4.4. <i>Laboratorijske analize</i>	164
4.4.1. <i>Mikrobiološka analiza uzoraka mleka i određivanje broja somatskih ćelija</i>	164
4.4.2. <i>Kompletna krvna slika</i>	165
4.4.3. <i>Analiza fagocitne sposobnosti neutrofilnih granulocita i monocita (fago-test reakcija neutrofilnih granulocita i monocita)</i>	166
4.4.4. <i>Analiza respiratornog praska neutrofilnih granulocita i monocita (fago-burst reakcija neutrofilnih granulocita i monocita)</i>	169
4.5. <i>Statistička obrada rezultata</i>	174

5. REZULTATI	175
5.1. Rezultati CM testa, mikrobiološke analize mleka i određivanja broja somatskih ćelija u kontrolnoj i oglednoj grupi (pre i nakon terapije vitaminom C)	176
<i>5.1.1. Rezultati CM testa</i>	<i>176</i>
<i>5.1.2. Rezultati mikrobiološkog ispitivanja uzoraka mleka svih grla u ogledu</i>	<i>177</i>
<i>5.1.3. Rezultati ispitivanja broja mikroorganizama (CFU) u mleku krava nakon terapije vitaminom C</i>	<i>178</i>
<i>5.1.4. Rezultati ispitivanja broja somatskih ćelija u mleku krava nakon terapije vitaminom C</i>	<i>179</i>
5.2. Rezultati ispitivanja hematološkog profila nakon terapije vitaminom C	180
<i>5.2.1. Bela krvna slika u kontrolnoj grupi i grupi krava tretiranih vitaminom C</i>	<i>180</i>
<i>5.2.2. Crvena krvna slika krava u kontrolnoj grupi i grupi krava tretiranih vitaminom C</i>	<i>185</i>
<i>5.2.3. Trombociti i prosečna zapremina trombocita u kontrolnoj grupi i grupi krava tretiranih vitaminom C</i>	<i>188</i>
5.3. Rezultati ispitivanja fagocitne sposobnosti i respiratornog praska PMNL i monocita iz krvi krava nakon terapije vitaminom C	189
<i>5.3.1. Rezultati ispitivanja fagocitne sposobnosti PMNL iz krvi krava nakon terapije vitaminom C</i>	<i>189</i>
<i>5.3.2. Rezultati ispitivanja fagocitne sposobnosti monocita iz krvi krava nakon terapije vitaminom C</i>	<i>190</i>
<i>5.3.3. Rezultati ispitivanja respiratornog praska PMNL krvi krava nakon terapije vitaminom C</i>	<i>191</i>
<i>5.3.4. Rezultati ispitivanja respiratornog praska monocita iz krvi krava nakon terapije vitaminom C</i>	<i>193</i>
5.4. Rezultati ispitivanja funkcionalne aktivnosti polimorfonuklearnih leukocita i monocita iz mleka krava nakon terapije vitaminom C	194
<i>5.4.1. Rezultati ispitivanja fagocitne sposobnosti PMNL iz mleka krava nakon terapije vitaminom C</i>	<i>194</i>
<i>5.4.2. Rezultati ispitivanja fagocitne sposobnosti monocita iz mleka krava nakon terapije vitaminom C</i>	<i>195</i>
<i>5.4.3. Rezultati ispitivanja respiratornog praska PMNL iz mleka krava nakon terapije vitaminom C</i>	<i>195</i>
<i>5.4.4. Rezultati ispitivanja respiratornog praska monocita iz mleka krava nakon terapije vitaminom C</i>	<i>197</i>
6. DISKUSIJA	199
6.1. CM test, mikrobiološke analize mleka i broj somatskih ćelija u kontrolnoj i oglednoj grupi krava (pre i nakon terapije vitaminom C)	199
<i>6.1.1. Rezultati CM testa u uzorcima mleka svih grla u ogledu</i>	<i>199</i>
<i>6.1.2. Mikrobiološko ispitivanje uzoraka mleka svih grla u ogledu</i>	<i>201</i>
<i>6.1.3. Broj somatskih ćelija u mleku</i>	<i>202</i>
6.2. Hematološki profil nakon terapije vitaminom C	202
<i>6.2.1. Bela krvna slika u kontrolnoj grupi i grupi krava tretiranih vitaminom C</i>	<i>202</i>
<i>6.2.2. Crvena krvna slika krava u kontrolnoj grupi i grupi krava tretiranih vitaminom C</i>	<i>206</i>
<i>6.2.3. Trombociti i prosečna zapremina trombocita u kontrolnoj grupi i grupi krava tretiranih vitaminom C</i>	<i>207</i>

6.3. Fagocitna sposobnost i respiratorni prasak PMNL i monocita iz krvi krava nakon terapije vitaminom C	208
<i>6.3.1. Ispitivanje fagocitne sposobnosti PMNL iz krvi krava nakon terapije vitaminom C</i>	208
<i>6.3.2. Fagocitna sposobnost monocita iz krvi krava nakon terapije vitaminom C</i>	209
<i>6.3.3. Respiratorni prasak PMNL iz krvi krava nakon terapije vitaminom C</i>	210
<i>6.3.4. Respiratorni prasak monocita iz krvi krava nakon terapije vitaminom C</i>	212
6.4. Funkcionalna aktivnost polimorfonuklearnih leukocita i monocita iz mleka krava nakon terapije vitaminom C	213
<i>6.4.1. Fagocitna sposobnost PMNL iz mleka krava nakon terapije vitaminom C</i>	213
<i>6.4.2. Fagocitna sposobnost monocita iz mleka krava nakon terapije vitaminom C</i>	214
<i>6.4.3. Respiratorni prasak PMNL iz mleka krava nakon terapije vitaminom C</i>	215
<i>6.4.4. Respiratorni prasak monocita iz mleka krava nakon terapije vitaminom C</i>	216
7. ZAKLJUČCI	223
8. LITERATURA	225
9. BIOGRAFIJA DOKTORANDA	
10. IZJAVA O AUTORSTVU, IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA, IZJAVA O KORIŠĆENJU	

1. UVOD

Proizvodnja mleka je jedna od vitalnih, odnosno strateških grana stočarske proizvodnje svake normalne države u svetu. Značajan porast stanovnika na planeti kao i sve veća potreba za hranom nameće potrebu povećanja svih proizvodnih parametara domaćih životinja, pa i mlečnih krava. Razvojem novih tehnologija i primenom najnovijih naučnih saznanja direktno u proizvodnji, danas smo došli do tačke gde je moguće proizvesti više nego ikada mleka po kravi u farmskim uslovima. Posledica vrlo intenzivne i uske selekcije na visoku mlečnost, kao i napretka u tehnologiji ishrane i držanja mlečnih krava dovela je do toga da današnja proizvodnja mleka u visoko-mlečnim zapaćtima bude i do 10.000 kg mleka po kravi godišnje. Ovakva proizvodnja se približava granici biološkog potencijala ove životinjske vrste.

Na nesreću svih proizvodnih životinja (u našem slučaju, muznih grla na farmama) današnji život nalaže značajno povećanje proizvodnje, odnosno profita, gde se u dobrom broju slučajeva krave "iscrpljuju" kako bi se obezbedila što veća proizvodnja mleka, na štetu njihovog zdravstvenog stanja. Selekcijom goveda ka visokoj mlečnosti koja je apsolutni imperativ danas, veoma često se zanemaruju drugi parametri koji su jako bitni za zdravstveno stanje same krave. Kao rezultat takve proizvodnje, pojavljuje se jedan od najvažnijih problema, upala mlečne žlezde - mastitis.

Posledice mastitisa krava mogu biti brojne i značajno uticati na ekonomsku isplativost proizvodnje mleka. Štete usled pojave zapaljenja mlečne žlezde i smanjene proizvodnje mleka čine i preko 70% svih gubitaka produkcije mleka dok lečenje mastitisa obuhvata i preko 50% svih intervencija na farmama mlečnih krava. Ekonomske posledice mastitisa se odnose na smanjenu produkciju mleka, neškodljivo uklanjanje neispravnog mleka i mleka lećenih krava, eliminisanje mlečnih krava iz dalje proizvodnje (*culling*), lećenja samog mastitisa u koje spadaju troškovi lekova i veterinarske usluge kao i specijalan tretman obolelih životinja.

Produkcija mleka po laktaciji kod obolele četvrti vimena krava se u proseku smanjuje i za oko 700 kg. Smatra se da je šteta nastala kao posledica mastitisa u vrednosti oko 10% godišnje proizvodnje mleka farme krava, od čega oko dve trećine tih troškova nose supklinički mastitisi.

Mastitisi smanjuju sintetski kapacitet mlečne žlezde što dovodi do smanjene koncentracije masti i kazeina u mleku. Smatra se da gubitak mlečne masti, odnosno smanjena produkcija mlečne masti u slučajevima kako kliničkih tako i supkliničkih mastitisa iznosi od 1,5-7,5%. Iako se koncentracija proteina u mleku tokom upale mlečne žlezde blago povećava, takvi proteini zapravo predstavljaju proinflammatorne proteine, nekoagulacione proteine i proteine surutke, dok se u takvom mleku količina kazeina smanjuje. Smatra se da gubitak proteina tokom mastitisa može iznositi i do 8,5%. Ono što najviše pogađa proizvođače mleka je svakako svaka promena koja utiče na ekonomsku vrednost mleka koju plaćaju mlekare. Tako recimo u Švedskoj mlekare najviše plaćaju mleko premijum kvaliteta koje sadrži 300 000 somatskih ćelija (SCC) po ml mleka i manje, dok se plaćaju kazne za mleko koje ima više od 401 000 somatskih ćelija po ml mleka. U ovome se ogleda još jedan aspekt ekonomskih gubitaka supkliničkih mastitisa.

Posledice mastitisa mlečnih krava projektuju ekonomsku štetu koja se u zemljama sa razvijenom industrijom mleka može meriti i milijardama dolara. U Velikoj Britaniji, prosečan trošak lečenja mastitisa po kravi se procenjuje na oko 175 funti (240 eura). Ukoliko se to preračuna na prosečan broj pojava mastitisa od 40 slučajeva na 100 krava godišnje i broj krava u Velikoj Britaniji od 2,4 miliona, dolazimo do cifre od 168 miliona funti (230 miliona eura) godišnjih troškova na lečenje mastitisa. Takođe, smatra se da je mastitis najčešći uzrok smrti mlečnih krava. Prema nekim istraživanjima, mortalitet mlečnih krava u slučajevima mastitisa iznosi 0,6 %. Još je teže izračunati štete koje su posledica supkliničkih mastitisa i koje nastaju kao rezultat lečenja, smanjene produkcije i kvaliteta mleka. Kao dodatak ovome, mora se naglasiti i uticaj, kako kliničkih, tako i supkliničkih mastitisa na samu fertilitet krava i razvoj njihove teladi.

Šteta koju izazivaju mastitisi vezana za eliminisanje mlečnih krava iz dalje proizvodnje, odnosno izlučivanja (engl. *culling*) je svakako važna komponenta ekonomskih gubitaka. Kao i gubitak mleka, skriveni gubitak predstavlja i izlučivanje, koji nije uvek jasno evidentno farmeru. Ono je uvek povezano sa troškovima zamene mlečnih krava i uključuje i troškove kupovine ili gajenja junica. Ukoliko na tržištu, u tom trenutku, ne postoji steona junica koja se može odmah kupiti, iskorišćavanje kapaciteta farme je smanjeno a troškovi održavanja same farme ostaju isti. Takođe se od krava prvotelkinja, ne može očekivati visoka proizvodnja mleka ili se može desiti da takvo grlo potpuno podbaci u proizvodnji mleka, odnosno da ne daje onu količinu mleka koja bi se od nje i očekivala. Izlučene krave

uglavnom nisu dostigle svoj produkcionni potencijal proizvodnje mleka, tako da se i ovo može smatrati štetom nastalom kao posledica mastitisa.

Osim ekonomskih šteta, ne treba prevideti svakako ni rizik po zdravlje ljudi. Intenzivna upotreba antibiotika u lečenju i kontroli mastitisa često dovodi do pojave rezistentnih sojeva bakterija koja svakako mogu imati po zdravlje ljudi i životinja. Potencijalno širenje zoonotskih bakterija, iako retko u eri pasterizacije, predstavlja rizik, pogotovo u slučajevima kvara mašina za pasterizaciju ili u specijalizovanim mlečnim marketima u kojima je relativno česta prodaja nepasterizovanih proizvoda.

Danas se u svetu sprovode brojni programi kontrole mastitisa krava. Ovi programi su na početku primene primarno obuhvatali kontrolu najčešćih kontagioznih uzročnika mastitisa (*Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*), a kasnije su u njih uključene i odgovarajuće mere za kontrolu mastitisa iz okruženja (npr. koliformni organizmi). Koagulaza negativne stafilokoke, neke druge streptokoke osim *S. agalactiae* i *S. Dysgalactiae*, a i neke druge vrste bakterija iz rodova *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Proteus*, *Pasteurella*, *Listeria*, *Leptospira*, *Yersinia*, *Enterobacter*, *Brucella*, *Mycoplasma* i *Mycobacterium* takođe mogu biti uzrok pojave mastitisa, uglavnom supkliničkog. Međutim, i neki drugi mikroorganizmi mogu biti odgovorni za pojavu mastitisa. Ovakve mere i postupci kontrole mastitisa su imali za cilj redukciju trajanja postojećih infekcija mlečne zlezde, sprečavanje pojave novih infekcija i kontinuirano praćenje efikasnosti primenjenih mera. Postavljeni zadatak je bio da se određenim postupcima eliminišu uzročnici mastitisa i smanji broj somatskih ćelija na što niži nivo.

Najvažnija karika u odbrani mlečne zlezde od patogena je nespecifični, odnosno urođeni imunitet. Dve kritične komponente ovog imunskog odgovora, prepoznavanje patogena i osiguravanje adekvatne reakcije imunskog sistema, predstavljaju kompleksnu interakciju ćelijskih i molekularnih procesa u eliminaciji patogenih mikroorganizama. Različite komponente humoralnog nespecifičnog odgovora kao što su komplement (CS), citokini, laktoferin (LF), transferin (TE), lizozim (LZ), komponente laktoperoksidaza /mijeloperoksidaza sistema, oligosaharidi, gangliozidi, reaktivne oksidativne vrste (ROS), proteini akutne faze (APPs), ribonukleaze i veliki broj antimikrobnih peptida i proteina predstavljaju primarnu odbranu mlečne zlezde od patogena.

Mlečna žlezda ima i svoj mehanizam odbrane celularnog tipa. U normalnom mleku, broj somatskih ćelija (SCC) je uglavnom do 1×10^5 , odnosno prema američkom standardu do

200.000 somatskih ćelija po mL mleka u tanku za skupljanje mleka (Dairy Herd Improvement Association, DHIA, USA). Somatske ćelije čine leukociti (neutrofilni granulociti, makrofagi, limfociti), eritrociti i epitelne ćelije. Najveći udeo u SCC čine leukociti, oko 75% dok oko 25% sačinjavaju epitelne ćelije i eritrociti. Svako zapaljenje mlečne žlezde, bilo ono kliničko ili supkliničko dovodi do povećanja broja somatskih ćelija mleka i to prvenstveno polimorfonuklearnih (PMN) neutrofilnih granulocita i oni predstavljaju sekundarnu ali i najvažniju komponentu odbrane mlečne žlezde.

Primarne funkcije neutrofilnih granulocita, kao najvažnije komponente imunskog sistema mlečne žlezde su fagocitoza, uništavanje stranih materija i patogenih bakterija. Njihov značaj, kao najvažnije karike nespecifičnog odgovora, ogleda se kod jedinki sa smanjenim brojem neutrofilnih granulocita u krvi - neutropenijom i ovakve jedinke su veoma podložne različitim bakterijskim i gljivičnim infekcijama. Tokom mastitisa, broj somatskih ćelija se uglavnom povećava sa 1×10^5 na 1×10^6 ćelija po mL mleka i najveći broj ovih ćelija čine neutrofilni granulociti čiji se udeo u somatskim ćelijama mleka (SCC), u slučajevima mastitisa, poveća na 90%.

Genetskom selekcijom mlečnih krava je pokušano smanjenje broja somatskih ćelija mleka (SCC) na nivo koji bi ispunjavao određene, nekada čak i neopravdane razloge. Broj somatskih ćelija u mleku krava može biti nizak i iznositi ispod 100 000 pa čak i ispod 50 000 somatskih ćelija/mL mleka. Postavlja se pitanje: da li bi nizak nivo somatskih ćelija imao možda i negativan uticaj na pojavu mastitisa jer možda upravo na taj način, smanjenjem broja leukocita, doprinosimo slabijoj odbrani mlečne žlezde od infekcija? Stoga se u poslednje vreme u naučnim istraživanjima izučavaju metode koje bi dovele do zadržavanja broja somatskih ćelija mleka na biološki optimalnom nivou uz istovremeno povećanje efikasnosti odbrambenih ćelija imunog sistema mlečne žlezde, prvenstveno neutrofilnih granulocita.

Uglavnom je, u ovoj oblasti, ispitivano dejstvo određenih dodataka ishrani u cilju kontrole mastitisa. Ovo se pre svega odnosi na cink, bakar, selen, vitamin E, vitamin A i beta karoten. Dodavanje vitamina E i selena dovodi do povećane aktivnosti i funkcije fagocitnih ćelija i smatra se da najveću korist od dodavanja ovih suplemenata zapravo ima mlečna žlezda zasušanih krava da bi se smanjila kasnija pojava mastitisa u laktaciji. Bakar ima prvenstveno dejstvo na funkciju imunskog sistema. Bakar je komponenta ceruloplazmina koji omogućava apsorpciju gvožđa i njegov transport. Takođe, bakar je značajan deo enzima superoksid dismutaze, enzima koji štiti ćelije od uticaja toksičnih kiseoničkih metabolita koji

se oslobađaju tokom fagocitoze. Brojne studije dokazuju da je dodavanje bakra u ishrani mlečnih krava u dozi 20 g/t hrane, 60 dana pre teljenja ima uticaj u smanjenju intramamarnih infekcija i broja somatskih ćelija mleka. Prvotelke koje su dodatno dobijale bakar u hrani, su imale blaže kliničke simptome mastitisa, u odnosu na junice koje nisu dobijale takvu suplementaciju. Cink je komponenta mnogih metaloenzima kao što su bakar-cink superoksid dismutaza, ugljena anhidraza, alkoholna dehidrogenaza, karboksipeptidaza, alkalna fosfataza i RNK polimeraza, koji učestvuju u metabolizmu ugljenih hidrata, proteina, masti i nukleinskih kiselina. Cink je takođe i komponenta timozina, hormona koji proizvode timociti a koji reguliše ćelijski imunski odgovor. Poznato je da vitamin A i beta karoten, takođe imaju ulogu u ulozi imunskog sistema mlečne žlezde. Ove supstance su odgovorne za održavanje funkcija epitela i imaju ulogu u održavanju stabilnosti i integriteta sluzokoža. Beta karoten takođe funkcioniše kao antioksidans koji smanjuje stvaranje superoksidnih jona u fagocitima. Ovi vitamini ispoljavaju stimulatorni efekat na ćelije imunskog sistema i utvrđena je njihova povezanost sa pojavom mastitisa mlečnih krava.

Vitamin C (askorbinska kiselina) se sintetiše od L-gulonske kiseline u somatskim ćelijama preživara i stoga do sada nije smatran značajnim vitaminom za preživare. Jedina njegova upotreba koja se do sada mogla opravdati je bila kod teladi mlađe od tri nedelje koja još nemaju sposobnost sinteze ovog vitamina. Neka istraživanja, međutim, dokazuju značajne pozitivne efekte posle suplementacije goveda ovim vitaminom. Tako je dokazano da parenteralna aplikacija vitamina C dovodi do poboljšane funkcije neutrofilnih granulocita bikova, a veće doze ovog vitamina sprečavaju negativan uticaj imunomodulatora na funkciju neutrofilnih granulocita. Utvrđeno je i da neutrofilni granulociti takođe imaju veću potrebu za askorbinskom kiselinom da bi obavljali sve svoje funkcije, kao što su migracija, adherencija, fagocitoza i citocidalna aktivnost. Osim imunomodulatornog efekta, askorbinska kiselina ima i neke druge uloge, učestvuje u hidrosilaciji lizina i prolina pri sintezi prokolagena i kolagena i indukciji reparacije tkiva, ulogu antioksidansa, ali i antiinflamatornog agensa.

Smatramo da bi jedna od mera poboljšanja odbrambene funkcije mlečne žlezde (koja je predmet ovog (i budućih) naučnih istraživanja na ovom polju mogla biti primena odgovarajuće doze parenteralno aplikovanog vitamina C u terapiji, a pre svega u profilaksi oboljenja krava u postpartalom periodu. Stoga je i cilj ovog istraživanja bio da se u farmским uslovima držanja visokomlečnih krava ispita mogućnost primene parenteralne aplikacije vitamina C i njegovog uticaja na pojačanje odbrambenih sposobnosti neutrofilnih granulocita (kao prve linije odbrane mlečne žlezde od mikroorganizama) kod krava sa utvrđenim

supkliničkim mastitisom u periodu od 10 do 30 dana posle teljenja. Takođe, cilj je bio da se dobijeni rezultati uporede sa rezultatima dobijenim kod netretiranih krava (kontrolna grupa) u istom periodu, istog pariteta i starosti, odnosno da se ustanovi da li primenjeni tretman može u nekim slučajevima da zameni dosadašnji klasičan način lečenja mastitisa primenom antibiotika.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Imunski sistem - odbrambeni mehanizam tela

Organizam životinja u sebi sadrži sve mehanizme koji su potrebni da bi se održao u životu, ima konstantnu telesnu toplotu i vlažnost i sadrži veliku količinu hranljivih sastojaka. Kao takva, tkiva životinja i ljudi su izuzetno privlačna mikroorganizmima, koji u njima nalaze resurse za svoje životne funkcije. S druge strane, složeni organizmi su razvilo sisteme kojima sprečavaju invaziju mikroorganizama korišćenjem različitih molekula i ćelija, utoliko što njihov opstanak zavisi od prevencije štete koju stvaraju takvi patogeni. Takav, kolektivan i koordinisani odgovor ćelija i molekula, je funkcija imunskog sistema, a sama reakcija na ulazak stranih supstanci u telo se naziva imunski odgovor (Abbas i sar., 2015). Fiziološka funkcija imunskog sistema je odbrana tela od infektivnih mikroorganizama. Međutim, i neinfektivne strane supstance mogu da izazovu odgovor imunskog sistema. Osim toga, normalni mehanizmi koji služe odbrani organizma od infekcija i eliminaciji stranih supstanci mogu u nekim slučajevima da izazovu i oštećenja sopstvenog tkiva. Tačnija definicija imunskog odgovora bi bila da je to reakcija organizma na komponente mikroorganizama, makromolekule kao što su proteini i polisaharidi, ali i mali molekuli, odnosno na sve supstance koje imunski sistem prepoznaje kao strane, bez obzira na fiziološke i patološke posledice takve reakcije.

Efikasna otpornost organizma na infekciju se smatra kritičnim mehanizmom zaštite integriteta životinja i ljudi i ona ne zavisi samo od jednog odbrambenog mehanizma. Da bi odbrana od infekcija bila efikasna, ona mora da uključi mnogostruke sisteme odbrane. Neki od ovih mehanizama mogu biti efektivni protiv većeg broja insulta, dok neki drugi mehanizmi uništavaju samo specifične mikroorganizme. Pojedini deluju samo na telesnim površinama da bi sprečili ulazak patogena u telo, dok neki drugi deluju unutar tela u cilju uništavanja nepoželjnih stranih materija koje su uspele da probiju prvu liniju odbrane. Neki mehanizmi su usmereni na odbranu od bakterijskih infekcija, neki na odbranu od virusa koji se nalaze unutar ćelija, a neki se mobilišu prilikom delovanja patogena većih dimenzija kao što su protozoe, gljivice, parazitski crvi ili insekti. Zaštita tela zavisi od kompleksnog sistema mehanizama koji saraduju i međusobno komuniciraju. Njihove uloge se međusobno dopunjuju u svrhu zajedničkog cilja, a to je kontrola gotovo svih opasnosti koje prete. Otkazivanje ovog kompleksnog sistema odbrane, bilo zbog uništenja neke od njegovih

komponenti ili zbog sposobnosti mikroorganizama da se suprotstave ili izbegnu njegovo dejstvo može rezultirati pojavom bolesti ili smrti (Tizard, 2013).

Imunski sistem kičmenjaka se sastoji od tri nivoa odbrane. Prvi nivo je fizička barijera prema infektivnim agensima koju obezbeđuju koža i sluzokože zajedno sa mukoznim sekretima koji oblažu epitel respiratornog, digestivnog i reproduktivnog sistema. Svaki infektivni agens koji pokušava da uđe u telo, mora proći ove površine koje su u velikoj meri nepremostiva barijera mikroorganizmima. Zbog toga, fizička oštećenja ovih barijera često dovode do infekcije. Drugi nivo odbrane obezbeđuje nespecifični, odnosno urođeni imunski odgovor, koji sačinjava veći broj molekula i ćelija i koji učestvuje u odbrani odmah nakon prvog kontakta sa patogenim mikroorganizmima. Ćelije urođenog, nespecifičnog odgovora su takođe odgovorne za aktiviranje trećeg nivoa imunskog sistema, specifičnog, adaptivnog imunskog sistema. Ćelije specifičnog odgovora učestvuju u odbrani organizma tek nakon njihove adaptacije prema specifičnom patogenu, stvarajući veći broj efektorskih ćelija i molekula (antitela).

2.1.1. Nespecifični (urođeni) i specifični (adaptivni) imunitet

Urođeni (nespecifični) imunski sistem predstavlja prvu liniju odbrane tokom infekcije i ima ključnu ulogu u ranom prepoznavanju patogena i započinjanju proinflatornog odgovora u imunskoj reakciji (Medzhitov i sar., 2000). Sa druge strane, stečeni imunski odgovor je odgovoran za eliminaciju patogena u kasnoj fazi infekcije i u generisanju imunološkog pamćenja. Za razliku od stečenog imunskog odgovora, primarni efektori urođenog imunskog odgovora su fagocitne ćelije i antigen prezentujuće ćelije (APC), kao što su granulociti, makrofazi i dendritične ćelije (DC), ali i ćelije ubice (NK, natural killers). Kao takav, urođeni imuni odgovor se smatra nespecifičnim (Iwasaki i sar., 2004). Osim ćelijskih komponenti nespecifičnog odgovora, u njemu učestvuju i humoralni, rastvorljivi efektori kao što su komplement, citokini, hemokini i proteini akutne faze. Nespecifični imunski sistem se sastoji od učesnika kojima nedostaje imunološko pamćenje i čije se karakteristike ne menjaju, koliko god da često dolaze u kontakt sa istim patogenom (Delves i sar., 2000).

Nespecifični imunitet je evolutivno najstariji deo imunskog sistema. Gotovo iste molekularne komponente se mogu naći i kod biljaka i kod životinja, sugerišući da je

nespecifični imunski odgovor nastao pre evolutivnog razdvajanja biljnog i životinjskog carstva (Hoffmann i sar., 1999). Urođeni imunski sistem prepoznaje evolutivno konzervirane strukture patogena, PAMPs (engl. *pathogen-associated molecular patterns*). Ove strukture uključuju nukleinske kiseline mikroorganizama, kao što su jednolančana ili dvolančana RNK (ribonukleinska kiselina) virusa, nemetilovana DNK (dezoksiribonukleinska kiselina) bakterija, tipične bakterijske proteine, kompleksne lipide i ugljene hidrate koji se ne nalaze na ćelijama sisara, kao što su lipopolisaharid (LPS) gram negativnih ili lipotehoična kiselina gram pozitivnih bakterija, ali i oligosaharide sa terminalnom manozom koji se mogu naći kod mikroorganizama ali ne i kod glikoproteina sisara (Janeway, 1992). Međutim, model koji je predložio Janeway nije objasnio dejstvo nespecifičnog imunog sistema na još neke hemijske molekule koji se ne javljaju samo kod mikroorganizama. Matzinger i sar. (1994) dokazuju da se efektori nespecifičnog imunskog sistema aktiviraju ne samo na komponente patogena nego i na unutarćelijske alarmne signale koje šalju ćelije koje umiru nefiziološkom smrću. Kod živih ćelija ovi signali bivaju skriveni, dok kod ćelija koje normalno umiru apoptozom ove signale eliminišu fagociti. Nasuprot tome, ćelije koje umiru nefiziološkom smrću ispuštaju svoj unutarćelijski sadržaj bez ikakve kontrole. Ovakvi unutarćelijski signalni molekuli koji dovode do reakcije nespecifičnog imunog odgovora se nazivaju DAMPs (engl. *damage-associated molecular patterns*) (Bianchi i sar., 2007; Lotze i sar., 2007).

Putem određenog broja genetski kodiranih receptora, nazvanih PRRs (engl. *pattern recognition receptors*) od kojih su svakako najpoznatiji TLRs (engl. *toll-like receptors*) nespecifični imunski sistem prepoznaje PAMPs i DAMPs. Nakon prepoznavanja mikrobnih receptora, PRRs aktiviraju transdukciju signala u cilju pokretanja antimikrobnih i proinflatornih funkcija ćelija na kojima se nalaze, uključujući molekule adaptore, kinaze i transkripcione faktore (Akira i sar., 2004). Ekspresija gena nakon aktivacije PRRs dovodi do sinteze velikog broja molekula, uključujući citokine, hemokine, ćelijske adhezivne molekule i imunoreceptore (Akira i sar., 2006) što dovodi do ranog odgovora na infekciju a u isto vreme predstavlja i vezu sa specifičnim imunskim odgovorom.

U određenom broju slučajeva, nespecifični imunski odgovor ne može da eliminiše infektivni agens i stoga u takvim slučajevima aktivacija specifičnog, adaptivnog imunog odgovora biva neophodna. U ovakvim slučajevima, nespecifičan imunski sistem "daje instrukcije" specifičnom delu imunskog sistema o prirodi patogenog insulta, time što vrši ekspresiju kostimulatornih molekula CD80 i CD86 na površini specijalizovanih antigen

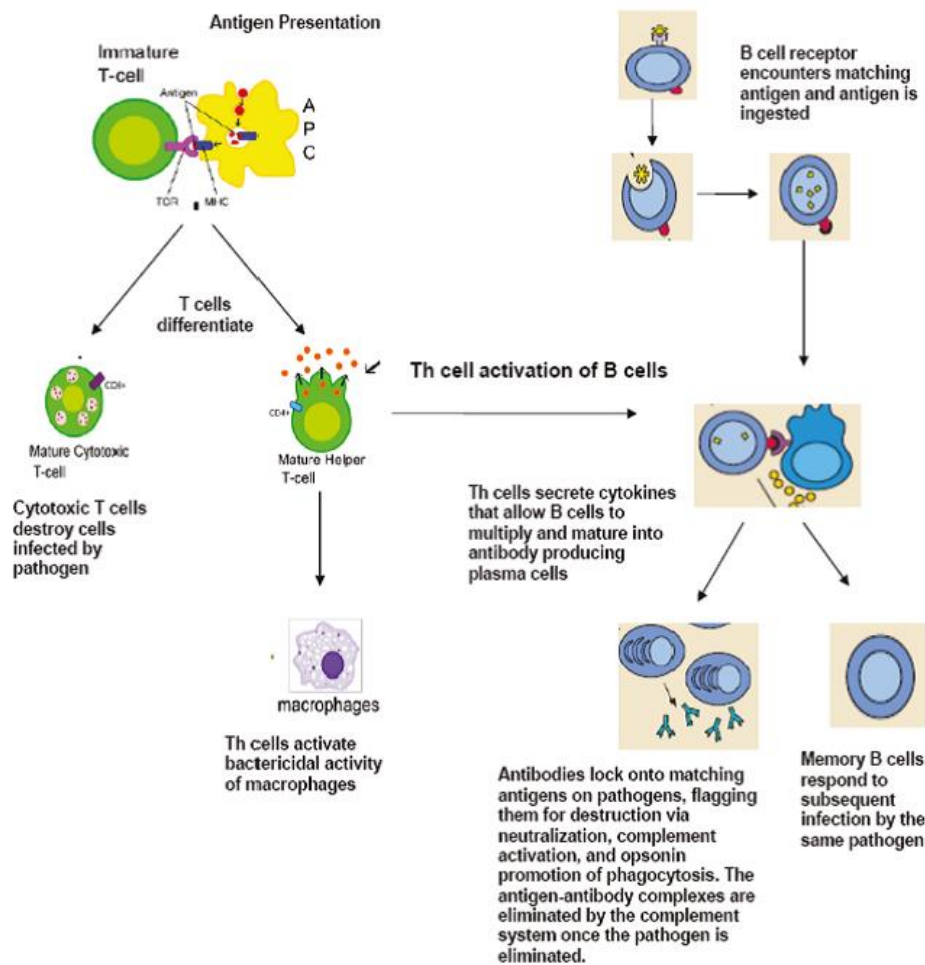
prezentujućih ćelija (APC) od kojih su najvažnije dendritične ćelije (DC). Ekspresija CD80 i CD86 molekula dovodi do aktivacije specifičnog imunskog odgovora (Fearon i sar., 1996; Banchereau i sar., 1998).

Primarna funkcija specifičnog, odnosno adaptivnog imunog odgovora je prepoznavanje specifičnih stranih (engl. *non-self*) antigena u prisustvu antigena sopstvenog tkiva (engl. *self antigena*), generisanje patogen-specifičnih imunoloških efektora koji eliminišu patogene ili patogenima inficirane ćelije i razvoj imunološke memorije koja može brzo eliminisati određeni patogen ukoliko dođe do ponovnog susreta sa njim (Bonilla i sar., 2010). Efektori specifičnog imunog odgovora su T limfociti, koji su odgovorni za ćelijski imuni odgovor i B limfociti koji proizvode antitela, odnosno efektorne molekule humoralnog specifičnog imunog odgovora. Oba tipa ćelija, T i B limfociti nastaju u kostnoj srži. Međutim, za razliku od B limfocita, T limfociti migriraju u timus u kome sazrevaju i u kojima se vrši njihova pozitivna i negativna selekcija, odnosno eliminišu se oni T limfociti koji nose receptore za ćelije sopstvenih tkiva, "self antigene". Iako zreli, ovi limfociti se ne mogu smatrati potpuno funkcionalnim, sve do momenta dok ne budu izloženi antigenu. Posle sazrevanja, T limfociti vrše ekspresiju ćelijskih površinskih antigen vezujućih molekula koji se nazivaju T ćelijski receptori (TCR). Oni se sastoje od dva transmembranska molekula $TCR\alpha$ i $TCR\beta$, koji su nastali reorganizacijom istoimenih gena. Za razliku od B limfocita, čija antitela vezana za membranu mogu da prepoznaju sam antigen, TCR mogu da prepoznaju samo peptidni antigen koji je vezan za molekule glavnog histokompatibilnog kompleksa (MHC) (Moss i sar., 1992).

MHC molekuli su ćelijski antigeni koji omogućavaju imunom sistemu (pre svega T limfocitima) da razlikuje svoje ćelije od ćelija mikroorganizama ili zaraženih sopstvenih ćelija. MHC I molekuli se nalaze na svim ćelijama sa jedrom, dok se MHC II molekuli nalaze samo na antigen prezentujućim ćelijama (APC) koje su deo nespecifičnog imunog odgovora i čiju stimulaciju vrši vezivanje antigena za TLR. MHC molekuli prve klase prezentuju endogene peptide dok MHC II molekuli prezentuju egzogene peptide T limfocitima. MHC proteini prezentuju fragmente antigena (peptide) T limfocitima u slučajevima kada je ćelija inficirana patogenom (kod virusnih infekcija) ili kada je fagocitovala stranu materiju (kod bakterijskih infekcija) (Murphy i sar., 2007). Antigen prezentujuće ćelije (APC) (najčešće dendritične ćelije, ali i makrofagi, B ćelije, epitelne ćelije i fibroblasti) su specijalizovane ćelije koje se u velikom broju nalaze u koži i sluzokožama,

gde postoji najveća mogućnost kontakta sa patogenima i aktivno unose egzogene proteine fagocitozom ili endocitozom (Stockwin i sar., 2000). Aktivacija APC dovodi ne samo do indukcije ekspresije MHC II klase molekula već i do migracije ovih ćelija iz kože i sluzokože do regionalnih limfnih čvorova gde dolazi do interakcije sa T limfocitima. Ovo dovodi do inicijacije specifičnog imunskog odgovora. Dendritične ćelije su jedine APC koje mogu da stimulišu T limfocite koji nikada nisu bili stimulisani antigenom, takozvane "virgin" T limfocite (Croft i sar., 1992).

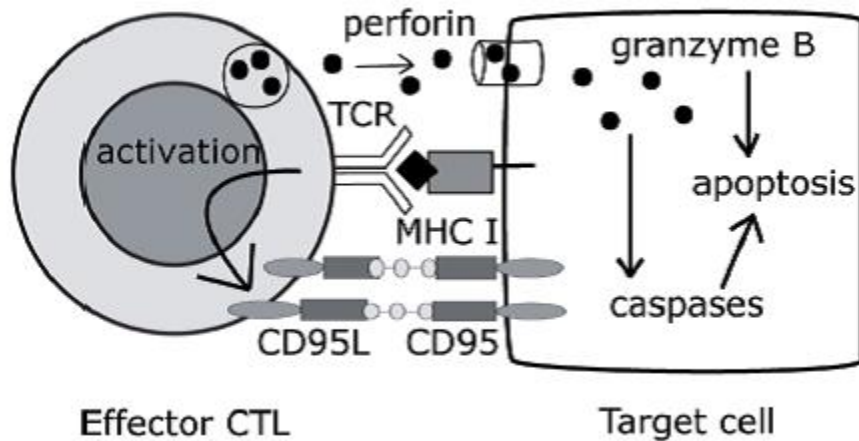
T limfociti se aktiviraju pri susretu sa APC (slika 2.1) koje su obradile antigen i prezentovale njegove peptidne fragmente vezane za MHC molekule. MHC-antigen kompleks aktivira TCR T limfocita što dovodi do sekrecije citokina koji dalje kontrolišu imunsku reakciju. Prezentovanje antigena T limfocitima stimuliše njihovu transformaciju u citotoksične (CD8+) T limfocite ili u helper (CD4+) T limfocite (Andersen i sar., 2006). Citotoksični (CD8+) T limfociti su primarno uključeni u uništavanje ćelija koje su inficirane intracelularnim patogenom, najčešće virusom, odnosno oni se aktiviraju jedino u interakciji njihovih TCR sa peptidnim antigenom vezanim za MHC I molekule (Zinkernagel, 1997).



Slika 2.1. Šematski prikaz aktivacije i diferencijacije T i B limfocita (Warrington i sar., 2011)

Klonalna ekspanzija citotoksičnih T limfocita dovodi do produkcije efektorskih ćelija koje oslobađaju tri vrste supstanci: perforine i granzime, koji vrše liziranje i granulizin koji indukuje apoptozu target ćelija (slika 2.2).

Nakon eliminisanja infekcije, najveći broj efektorskih ćelija umire i takve ćelije eliminišu fagociti. Međutim, određeni broj T limfocita se transformiše u memorijske T limfocite koji veoma brzo mogu da se diferentuju u efektorske ćelije pri ponovnom susretu sa istim patogenom.



Slika 2.2. Oslobađanje toksičnih supstanci nakon aktivacije T limfocita (Nijkamp i sar., 2011)

CD4⁺ T limfociti, odnosno T helper (T_h) limfociti imaju značajnu ulogu u obezbeđivanju adekvatne i maksimalne imunske reakcije. Ove ćelije nemaju ni citotoksičnu ni fagocitnu sposobnost i ne mogu da ubijaju inficirane ćelije ili patogene mikroorganizme. Međutim, T helper limfociti imaju ulogu da usmeravaju imunsku reakciju tako što stimulišu, odnosno usmeravaju druge ćelije imunskog sistema na citotoksične i fagocitne aktivnosti. CD4⁺ T limfociti čija je selekcija tek završena u timusu oslobađaju samo male količine citokina. Nakon stimulacije antigenom od strane APC, T helper limfociti počinju da proizvode interleukin 2 (IL-2) i takvi limfociti se nazivaju T_h0 limfociti. Progresivnom stimulacijom T_h limfocita dolazi do njihovog diferentovanja u T_h1, T_h2 i T_h17 i Treg (regulatorne) limfocite u zavisnosti od prisustva citokina na mestu njihove aktivacije. Ukoliko makrofagi i NK ćelije luče interleukin 12 (IL-12) T_h0 limfociti će se diferentovati u T_h1 limfocite, ukoliko NK ćelije, bazofili ili mast ćelije luče interleukin 4 (IL-4) doći će do diferencijacije u T_h2 limfocite, a ukoliko se T_h limfociti stimulišu sa transformišućim faktorom rasta beta (TGFβ) onda dolazi do nastanka takozvanih T_h17 limfocita (Sallusto i sar., 2009).

T_h1 limfociti luče uglavnom interferon gama (IFN γ) ali takođe i interleukin 2 (IL-2), tumor nekrotični faktor alfa (TNF α) i limfotoksin. Na taj način T_h1 limfociti pojačavaju ćelijsku imunsku reakciju aktivacijom mononuklearnih fagocita, NK ćelija i citotoksičnih T limfocita za potrebe eliminacije unutarćelijskih patogena (Bradley, 2003). T_h1 limfociti na ovaj način takođe aktiviraju i produkciju opsonizujućih izotipova imunoglobulina G klase

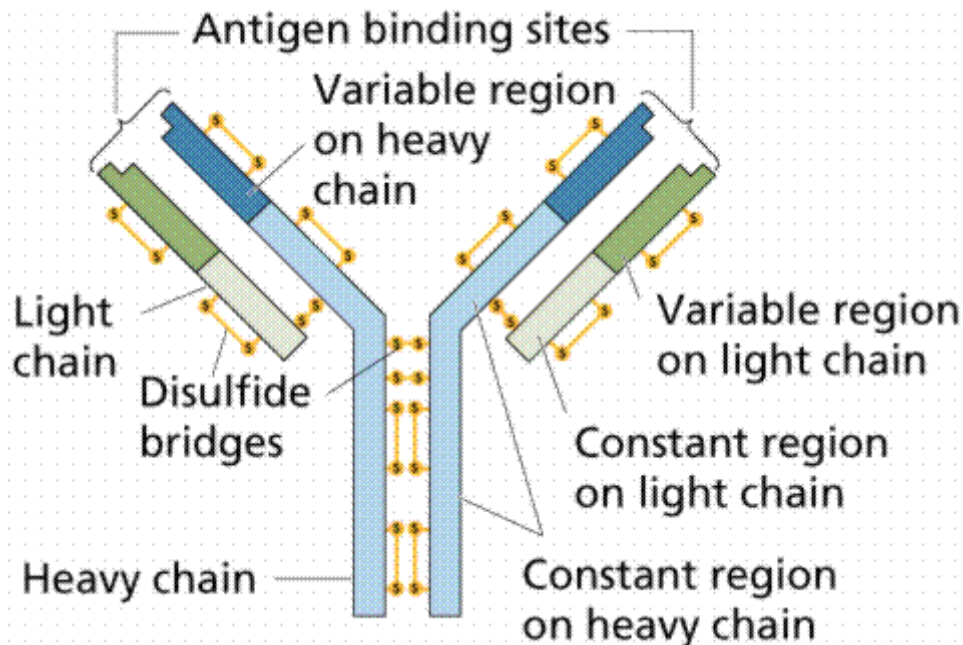
(IgG) (Nijkamp i sar., 2011). Prema Tuerlinckx i sar. (1997) nedostatak receptora za IFN γ dovodio je do povećane osetljivosti na infekcije koje izazivaju mikobakterije.

T_H2 limfociti vrše sekreciju interleukina 4 (IL-4), interleukina 5 (IL-5), interleukina 6 (IL-6), interleukina 10 (IL-10) i interleukina 13 (IL-13) i aktiviraju neinflamatorni imunski odgovor, odnosno produkciju antitela i to imunoglobulina klase G, A i E (IgG, IgA i IgE) za borbu protiv vanćelijskih patogena, kao i stimulaciju produkcije eozinofilnih granulocita za borbu protiv parazitskih infekcija (Parkin i sar., 2001).

T_H17 limfociti igraju važnu ulogu u imunskom odgovoru i ova grupa limfocita se prva generiše tokom infekcije. Iako lučenjem interleukina 17 (IL-17) dovode do hemotakse neutrofilnih granulocita i makrofaga na mesto infekcije i njihovog pojačanog stvaranja u kostnoj srži, ova grupa T limfocita se najčešće dovodi u vezu sa različitim autoimunim bolestima (Chen i sar., 2007; Mesquita i sar., 2009). Smatra se da u terapiji autoimunih bolesti, značajnu ulogu može imati izučavanje Treg limfocita, za koje se zna da imaju ulogu u održavanju imunološke auto-tolerancije i kontroli autoimunskog odgovora (Cruvinel i sar., 2008). Ovi imunoregulatorni limfociti luče immunosupresivne interleukine, pre svega IL-4 i IL-10 i TGF- β čime obezbeđuju modulaciju imunskog odgovora (Sakaguchi i sar., 1995).

B limfociti i njihovi produkti, antitela, odnosno imunoglobulini (Ig) su efektori specifičnog humoralnog imuniteta (LaRosa i sar., 2008). Antitela imaju ulogu neutralizacije patogena i toksina, omogućavaju opsonizaciju i aktiviraju komplement. U većini slučajeva antitela vrše funkciju usmeravanja ostalih komponenti imunskog sistema za borbu protiv patogenih mikroorganizama (Delves i sar., 1998). B limfociti nastaju od hemopoetične matične ćelije u kostnoj srži. Zreli B limfociti napuštaju kostnu srž, ulaze u cirkulaciju i migriraju do sekundarnih limfoidnih organa (Rudin i sar., 1998). Na membrani zrelih B limfocita nakon sazrevanja nalaze se molekuli odgovorni za prepoznavanje antigena i oni se nazivaju B ćelijski receptori (BCR), a zapravo predstavljaju imunoglobuline M i D klase (IgM i IgD). Ovaj proces razvoja B limfocita i njihovih receptora, bez kontakta sa antigenom, se naziva antigen nezavisan B limfocitni razvoj. Svaki molekul imunoglobulina (Ig) se sastoji od dva teška lanca i dva laka lanca koji su povezani disulfidnim vezama. Postoji pet tipova teških lanaca i to α , γ , δ , ϵ i μ , na osnovu kojih su definisane klase imunoglobulina Ig A, IgG, IgD, IgE i IgM. Takođe, postoje i dva tipa lakih lanaca, kapa (κ) i lambda (λ). Svaki molekul imunoglobulina je podeljen na konstantni deo (Fc) i varijabilni deo (Fab) koji zajedno

sačinjavaju strukturu u obliku slova Y (slika 2.3). Varijabilni deo Ig je odgovoran za vezivanje antigena i raspored aminokiselina u ovom delu, određujući njegovu specifičnost za određeni antigen (Ag).



S

Slika 2.3. Šematski prikaz strukture imunoglobulina

(<http://www2.estrellamountain.edu/faculty/farabee/BIOBK/BioBookIMMUN.html>)

Antitela IgA klase su dimeri ili monomeri. Postoje dve klase IgA: IgA_1 i IgA_2 . IgA_1 se uglavnom nalaze u krvi dok je najveća koncentracija IgA_2 na sluzokožama gastrointestinalnog, respiratornog ili urogenitalnog trakta, u pljuvački, suzama i mleku. Ona imaju ulogu sprečavanja ulaska patogena i nazivaju se sekretorna antitela. Sekretorni IgA je dimer koji se sastoji od dva manja molekula IgA koji su povezani J lancem i sekretornom komponentom. Sekretorna komponenta je vezana za IgA unutar epitelnih ćelija mukoze i ima ulogu sprečavanja degradacije ovih antitela od strane enzima koji se nalaze u sekretima. Antitela IgD klase su monomeri. Ona se u maloj koncentraciji nalaze u krvi a njihova primarna uloga je u tome što su deo membranskog receptora (BCR) zrelih B limfocita. IgE antitela su monomerni imunoglobulini i normalno se nalaze u niskim koncentracijama u cirkulaciji. Ova antitela imaju veoma specijalizovanu ulogu u borbi protiv parazitskih infekcija i u medijaciji alergijske reakcije. Vezivana su za mastocite i bazofilne granulocite i po kontaktu sa antigenima dovode do oslobađanja histamina. Antitela IgM klase su najveći

globulini budući da se sastoje od pet manjih molekula (pentameri) koji su povezani J lancem. IgM se sintetisuje tokom inicijalnog, primarnog odgovora na antigene. Ova klasa antitela se sintetisuje rano u neonatalnom životu i njihova sinteza se povećava tokom intrauterinih infekcija. Imunoglobulini M klase takođe imaju ulogu receptora B limfocita (BCR). Ig G su najzastupljenija grupa imunoglobulina i čine 80-85% svih antitela u krvi. Kod ljudi postoje 4 klase ovih imunoglobulina, IgG₁, IgG₂, IgG₃ i IgG₄. Ova klasa antitela je dominantna u sekundarnom imunskom odgovoru (Huether i sar., 2013).

Druga faza razvoja B limfocita se odigrava nakon kontakta sa antigenom i posledične aktivacije i ova faza se naziva antigen zavisna faza. Za razliku od T limfocita, B limfociti mogu i direktno da prepoznaju antigene, bez njihovog prezentovanja na antigen prezentujućim ćelijama (APC) (Bonilla i sar., 2010). U zavisnosti od samog kontakta sa antigenom i uticaja citokina, B limfociti nakon aktivacije postaju ili memorijske ćelije koje se mogu brzo aktivirati u kontaktu sa istim antigenom ili plazma ćelije koje proizvode velike količine imunoglobulina.

Antigeni dolaze do sekundarnih limfoidnih organa putem cirkulacije, u obliku imunskih kompleksa ili transportovani od strane dendritičnih ćelija (DC) (Bergtold i sar., 2005). Ćelijski receptori folikularnih B limfocita (BCR) vezuju antigen, unose ga endocitozom, obrađuju i prezentuju u kompleksu sa MHC II molekulima. Folikularni B limfociti migriraju do granice između T limfocitne zone i B limfocitnog folikula pri čemu dolaze u kontakt sa T_h limfocitima. Ovakav kontakt dovodi do oslobađanja T limfocitnih citokina i CD40 koji stimulišu dalju aktivaciju B limfocita.

Aktivirani B limfociti migriraju u folikule sekundarnih limfoidnih organa i uz konstantnu stimulaciju T limfocita iniciraju stvaranje germinalnog centra (GC) ili migriraju u marginalnu zonu gde dolazi do njihovog diferentovanja u kratkoživeće plazma ćelije (Allen i sar., 2007). One izlučuju antitela 2-3 nedelje i time omogućavaju brz humoralni imunski odgovor. Nasuprot tome, B limfociti koji su formirali germinalni centar ulaze u proces somatske hipermutacije (SHM) nakon čega dolazi do promene klase imunoglobulina koje stvaraju (engl. *class switching*) (Stavnezer i sar., 2008). U procesu promene klase antitela dolazi do zamene stvaranja IgM i IgD, antitela niskog afiniteta u specifična antitela visokog afiniteta klase IgG, IgA i IgE (McHeyzer-Williams i sar., 2005). B limfociti koji izlaze iz germinalnog centra (GC) se razvijaju u dugoživeće memorijske B limfocite sa visokim

afinitetom za specifični antigen. Ovakva aktivacija B limfocita nakon asistencije T_h limfocita naziva se T zavisna aktivacija.

Tada B limfociti prepoznaju i neproteinske antigene kao što su polisaharidi i glikolipidi, a koji ne mogu biti obrađeni i prezentovani u kompleksu sa MHC II molekulima. Ovakvi antigeni koji dovode do nastanka antitela bez asistencije T_h limfocita nazivaju se T nezavisni antigeni (TI) a sama aktivacija je onda T nezavisna aktivacija. Neki molekuli, kao što su lektini biljaka, mogu sami da indukuju stvaranje antitela i nazivaju se TI antigeni (Richards i sar., 2008). Polimerizovani proteini i polisaharidi koji poseduju ponavljajuće sekvence mogu da reaguju sa B limfocitnim receptorima (BCR) većeg broja limfocita. Ovakav aktivirajući signal, uz sadejstvo citokina dendritičnih ćelija (DC) dovodi do formiranja plazma ili ćelija pamćenja (Vos i sar., 2000). Ti antigeni nazivaju se TI-2 antigeni. U mnogim slučajevima, ovakvi antigeni ne aktiviraju samo BCR, već i neke druge receptore na ćelijama imunskog sistema dovodeći do složenog imunskog odgovora (He i sar., 2004).

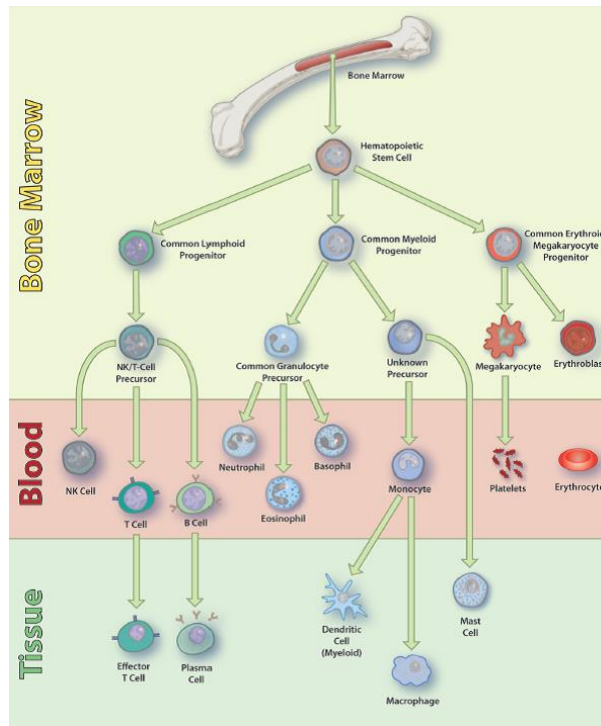
2.2. Leukociti, uloga u nespecifičnom imunskom odgovoru

Nespecifični imunski sistem predstavlja sistem rane odbrane od patogenih mikroorganizama i sačinjavaju ga ćelije opšteg efekorskog sistema i rastvorljivi faktori kao što su komplement i proteini akutne faze (engl. *acute phase proteins* - APP). Za razliku od specifičnog adaptivnog imunskog sistema, čiji se efektori uglavnom nalaze u organima kao što su limfni čvorovi, slezina ili timus, ćelije nespecifičnog imunskog sistema se nalaze u svim tkivima organizma. Iako imaju različitu anatomsku distribuciju, one vode poreklo od iste matične ćelije kostne srži (Callahan i Ya, 2014).

Ćelije imunskog sistema nastaju u kostnoj srži u procesu hematopoeze. Kao što i sama reč hematopoeza sugeriše, u ovom procesu se ne stvaraju samo ćelije imunskog sistema već i ostale ćelije krvi, eritrociti (engl. *red blood cells* - RBC) i krvne pločice - trombociti. Broj ćelija koji nastaje u kostnoj srži od matične (stem) ćelije iznosi i 10^{11} - 10^{12} ćelija dnevno.

U procesu hematopoeze nastaju tri ćelijske loze: eritroidna, mijeloidna i limfoidna (Callahan i Ya, 2014). Od eritroidne loze primarno nastaju eritrociti i trombociti, dok ćelije imunskog sistema vode poreklo od mijeloidne, odnosno limfoidne loze. Limfoidna loza krvnih ćelija dovodi do stvaranja limfocita koji su efektori specifičnog (adaptivnog) imunskog odgovora, ali i ćelije ubice (natural killers, NK) koje su efektori nespecifičnog (urogenog) imunskog sistema. Prekursori najvećeg broja ćelija nespecifičnog imunskog

sistema pripadaju mijeloidnoj lozi ćelija krvi. Ćelije nespecifičnog imunskog odgovora nastale od mijeloidne loze su monociti, makrofagi i mijeloidne dendritične ćelije (ćelije monocitno-makrofagnog sistema), mastociti (mast ćelije) i granulociti (bazofili, eozinofilni granulociti i neutrofilni granulociti). Ćelije imunskog sistema nastale od limfoidne i mijeloidne loze jednim nazivaju se bela krvna zrnca, odnosno leukociti (slika 2.4).

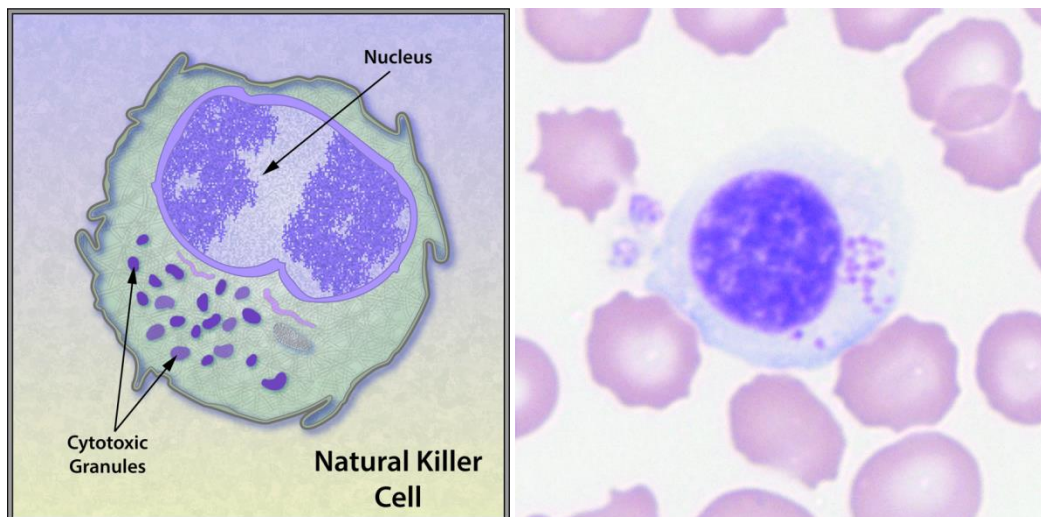


Slika 2.4. Šematski prikaz hematopoeze (Callahan i Ya, 2014)

2.2.1. NK ćelije

NK (natural killers) ćelije se na mikroskopskim preparatima uočavaju kao veliki granulisani limfociti koje definiše prisustvo određenog broja NK stimulatornih receptora uključениh u citotoksične interakcije sa ciljnim (target) ćelijama.

Zrele NK ćelije u cirkulaciji mogu da sačinjavaju od 2 do 15 procenata ukupnih limfocita. One su veće nego većina cirkulišućih limfocita i u njihovoj citoplazmi se nalaze azurofilne granule koje sadrže proteine granzime i perforine (slika 2.5), zbog kojih NK ćelije i imaju citotoksičnu aktivnost (Callahan i Ya, 2014).



Slika 2.5. NK ćelija na krvnom razmazu (Callahan i Ya, 2014)

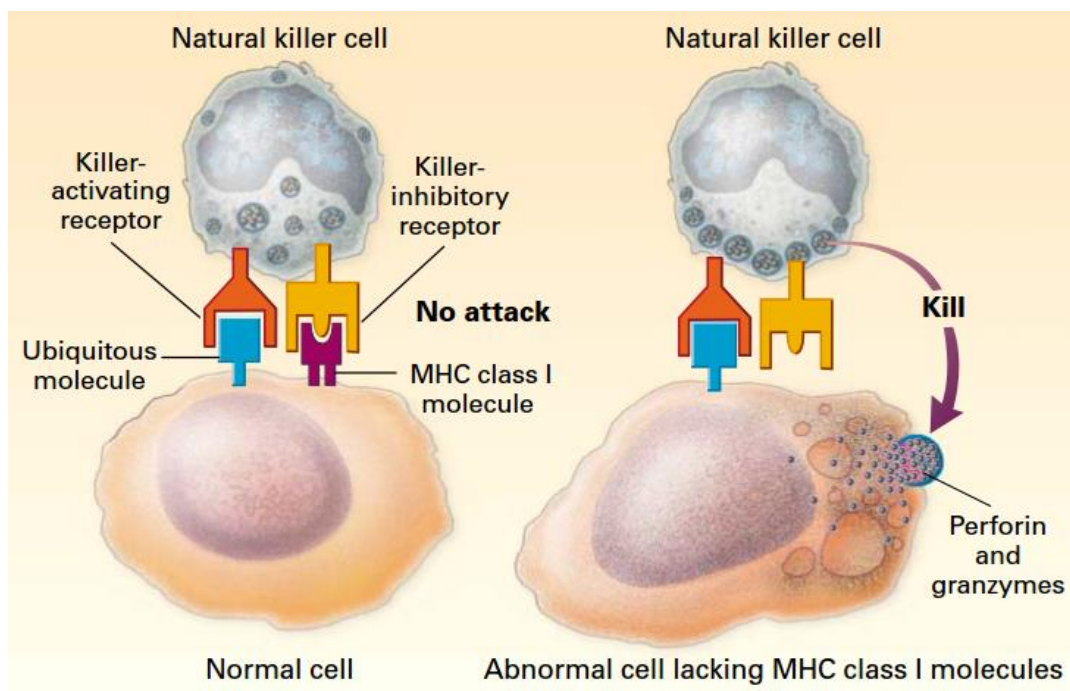
NK ćelije ne vrše ekspresiju ni T ćelijskih receptora (TCR) ni B ćelijskih receptora (BCR), što ih razlikuje, kako od T i B limfocita, tako i od NKT limfocita koji imaju karakteristike i NK ćelija ali i T i B limfocita.

Receptori na NK ćelijama nisu kodirani genima koji ulaze u proces rekombinacije (engl. *recombination activating gene*, RAG) kao što je to slučaj sa T i B limfocitima i stoga se NK ćelije, iako nastale od limfoidne loze hematopoetskih ćelija, smatraju ćelijama urođenog, nespecifičnog imunskog odgovora. Još od njihovog otkrića (Goverts, 1960) se zna da imaju značajnu ulogu u odbrani organizma od virusnih infekcija, tumora i u reakciji odbacivanja transplantata (Brandstadter i sar., 2011). Osim ovih, Jonjic i sar. (2008) opisuju i ulogu NK ćelija u modulaciji imunskog odgovora putem sekrecije određenih limfokina i interakcije sa antigen prezentujućim ćelijama (APC). NK ćelije se u telu mogu naći u krvi, limfoidnim tkivima, različitim organima i na mestima inflamacije (Dalbeth i sar., 2004). Ekspanziju i aktivaciju NK ćelija stimulišu interleukin 15 (IL-15) koji sekretuju makrofazi, ali i interleukin 12 (IL-12), koji indukuje stvaranje interferona gama (IFN- γ) i citolitičke aktivnosti. Nakon aktivacije, NK ćelije vrše liziranje inficiranih i tumorskih ćelija i luče proinflamatorne citokine interleukin 1 i 2 (IL-1 i IL2) i IFN- γ (Cerwenka i sar., 2001).

NK ćelije prepoznaju i ubijaju inficirane ili maligne ćelije na dva načina (Biron i sar., 1999). Kao i mnoge druge ćelije, NK ćelije imaju Fc receptore, konkretno Fc γ RIII (CD16) kojima vezuju imunoglobuline G klase (IgG) koji su opsonizovali target ćeliju i ubijaju je u

procesu koji se zove antigen zavisna ćelijska citotoksičnost (engl. *antibody-dependent cellular cytotoxicity* - ADCC) (Cerwenka i sar., 2001). Drugi sistem prepoznavanja target ćelija je karakteristika samo NK ćelija. Ovaj sistem se zasniva na posedovanju receptora za aktivaciju ubijanja ćelija (engl. *killer-activating receptors*, *killer inducing receptors*, KIR) koji prepoznaju različit broj molekula koji se nalaze na površini svih ćelija sa jedrom i receptora za inhibiciju ubijanja koji prepoznaju molekule glavnog kompleksa tkivne histokompatibilnosti prve klase (MHC I), koji se takođe nalaze na svim ćelijama sa jedrom (Morreta i sar., 1997; Lanier, 1998). KIR pripadaju superfamiliji imunoglobulinskih proteina, dok receptori inhibicije na NK ćelijama pripadaju familiji lektina tipa C. Kod ljudi je do sada identifikovano 14 ovakvih receptora, od kojih je osam aktivatora a šest inhibitora NK efektorske funkcije (Yokoyama i sar., 2004).

Inhibitorni signal MHC I molekula inhibira uništavanje ćelija od strane NK ćelija. U slučajevima kada ne dolazi do ekspresije molekula MHC I klase na membrani ćelija kao što je to slučaj tokom mikrobne interferencije sa mehanizmima ekspresije MHC I tokom infekcije virusima ili tumorske transformacije, tada neće ni postojati inhibitorni signal prema NK ćelijama. NK ćelije se tada vezuju preko aktivacionog signala na target ćelijama i uništavaju izmenjenu normalnu ćeliju stvaranjem otvora u njenoj membrani perforinima i ubacivanjem citotoksičnih granzima (Delves i sar., 2000) (slika 2.6).



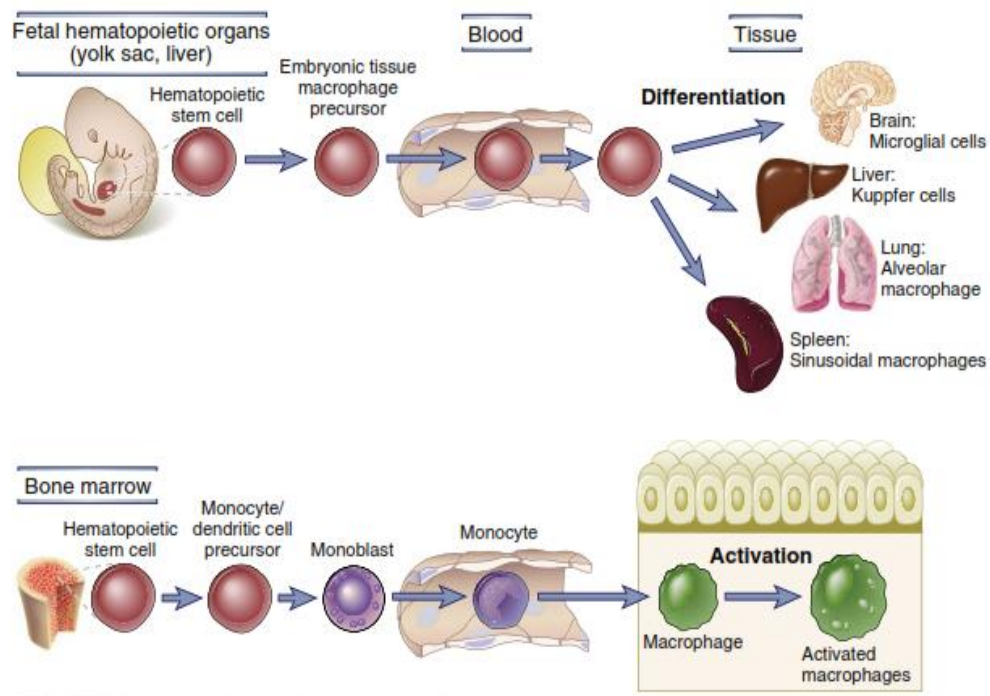
Slika 2.6. Interakcija NK limfocita sa target ćelijom (Delves i sar., 2000)

2.2.2. Čelije monocitno-makrofagnog sistema i mijeloidne dendritične ćelije

Mononuklearni fagocitni sistem se definiše kao populacija ćelija koja vodi poreklo od progenitorske ćelije kostne srži (slika 2.7), a koja se diferencira u formu krvnih monocita, koji cirkulišu u krvi a zatim ulaze u tkiva u kojima postaju fiksni tkivni makrofagi (van Furth, 1992).

Monociti i makrofagi su esencijalne komponente nespecifičnog, urođenog imunskog sistema. Oni predstavljaju heterogenu familiju profesionalnih fagocitnih ćelija odgovornih za prepoznavanje i uništavanje patogenih mikroorganizama i mrtvih ćelija. Monociti i makrofagi imaju glavnu ulogu u otpočinjanju, ali i završetku zapaljenjske reakcije učestvujući u fagocitozi, oslobađanju inflamatornih citokina, reaktivnih kiseonikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i aktivacijom specifičnog imunskog odgovora (Auffray i sar., 2009).

Ćelije monocitno-makrofagnog sistema, uključujući i mijeloidne dendritične ćelije, vode poreklo od zajedničke mijeloidne progenitorske ćelije kostne srži (Gordon, 2007). Dendritične ćelije su poseban tip ćelija, koje su morfološki i funkcionalno slične makrofagima (Bajer i sar., 2003).



Slika 2.7. Geneza i diferencijacija monocita i makrofaga (Abbas i sar., 2015)

U normalnim uslovima, monociti cirkulišu krvotokom veoma kratko pre nego što uđu u proces spontane apoptoze (Fahy i sar., 1999). Pod uticajem faktora diferencijacije sprečava se spontana apoptoza monocita koji ulaze u tkiva u kojima se diferenciraju u tkivne makrofage koji se nalaze u svakom organu (Wiktor-Jedrzejczak i sar., 1996). Sudbina monocita u krvi zavisi od prisustva proteina koji regulišu njihovu apoptozu. Ukoliko makrofagi luče veću količinu „*heat shock proteina*” 27 (Hsp 27), tada dolazi do inhibicije aktivacije kaspaze-3 koja je esencijalna za apoptozu monocita (Voss i sar., 2007). Na ovaj način, prema Goyal i sar. (2002) tkivni makrofagi inhibiraju apoptozu monocita i održavaju inflamatorni odgovor. Nakon završetka infekcije i inflamatorne reakcije, program spontane apoptoze monocita se nastavlja čime se omogućava okončanje imunske reakcije (Savill i Fadok, 2000).

Monociti ljudi se na osnovu antigenih markera CD14 i CD16 mogu podeliti na tri diskretne subpopulacije: klasične CD14+CD16⁻, intermedijarne CD14⁺⁺CD16⁺ i neklasične CD14+CD16⁺. Slično ovome, monociti goveda se dele na iste subpopulacije monocita (klasične, intermedijarne i neklasične) (Coquillard i sar., 2009), pri čemu 90% monocita sačinjavaju monociti klasičnog podtipa, 6% monociti neklasičnog tipa a 4% monociti intermedijarnog podtipa. Osim CD14 i CD16 antigenskih markera, monociti goveda vrše i ekspresiju nekih drugih markera kao što su CD163 i CD172 (Sheldon i sar., 2014).

Poluvreme života monocita u krvi ljudi iznosi 70 sati, 18 sati kod miševa, dok ovo vreme kod goveda iznosi od 20 do 23 časa. Nakon otpuštanja monocita iz kostne srži i njihovog ulaska u cirkulaciju, dolazi do njihove distribucije pri čemu se najveći broj monocita nalazi prilepljen za endotel kapilarnog krvnog sistema (egl. *marginal pool*) dok manji broj ostaje u cirkulaciji većih krvnih sudova (engl. *circulating pool*). Stimulusi kao što su infektivni mikroorganizmi dovode do redistribucije monocita pri čemu dolazi do povećanja broja monocita u cirkulaciji. Kao odgovor na infekciju, monociti se akumuliraju na mestu zapaljenja. Kod teladi, monociti su aktivni već nakon 2 sata od ulaska bakterija, pri čemu se naglo povećava njihova fagocitna aktivnost i aktivacija sistema ubijanja (Stieler i sar., 2012). Ovo zavisi od ekspresije molekula integrina i selektina i njihove interakcije sa receptorima na endotelu krvnih sudova i hemokinima koji se nalaze na mestu zapaljenja (Ono i sar., 2003).

Monociti kontinuirano migriraju iz krvi u periferna tkiva (Stafford i sar., 2002; Gordon, 2005; Lichtman i sar., 2006). U zavisnosti od tkiva u kome se odvija inflamatorni proces monociti se diferenciraju u različite podtipove tkivnih i slobodnih dugoživećih makrofaga. Tkivni makrofagi uključuju makrofage jetre (Kupferove ćelije), nervnog sistema (mikroglialne ćelije), vezivnog tkiva (histioci), gastrointestinalnog trakta, kostiju (osteoklasti) i alveolarne makrofage (Gordon i Taylor, 2005). Inflamatorni makrofagi uključuju epiteloidne i multinuklearne gigantske ćelije, dok se prema Longworth (1997) kao posebni podtip kod preživara, svinja, konja, mačaka, miševa i pacova mogu izdvojiti i plućni intravaskularni makrofazi koji imaju ulogu „hvatanja” cirkulišućih patogena u plućima. Diferencijacija monocita u makrofage donosi i promene u strukturi samih ćelija, pri čemu se sa povećanjem ćelija povećava i broj mitohondrija što zavisi od fagocitne aktivnosti, lizozomnih granula i sadržaj kiselih hidrolaza u njima, ali i kapacitet Goldži kompleksa. Makrofagi imaju veliki broj površinskih mikrovila i konstantno su uključeni u proces pinocitoze čime unose velike količine tečnosti, dok se, ukoliko su uključeni u proces fagocitoze mogu videti i fagolizozomi.

Prema Geissmann i sar. (2010), postoji veliko preklapanje u ekspresiji površinskih markera među različitim tipovima makrofaga. Stoga je prema Cros-u i sar. (2010) jedina mogućnost karakterizacije makrofaga kvantifikacija ekspresije gena nakon stimulacije citokinima i mikroorganizmima. Do sada je opisano nekoliko tipova makrofaga na osnovu njihovih funkcija. Klasično aktivisani makrofagi (M1 makrofagi) su uključeni u odbranu protiv različitih bakterija, protozoa i virusa, a imaju i ulogu u antitumorskoj odbrani. Alternativno aktivisani makrofagi (M2 makrofazi) imaju antiinflamatornu funkciju i regulišu zarastanje rana. Regulatorni makrofagi luče velike količine interleukina 10 (IL-10) nakon vezivanja Fc receptora gama (FcR γ) (Sutterwala i sar., 1997; Sutterwala i sar., 1998).

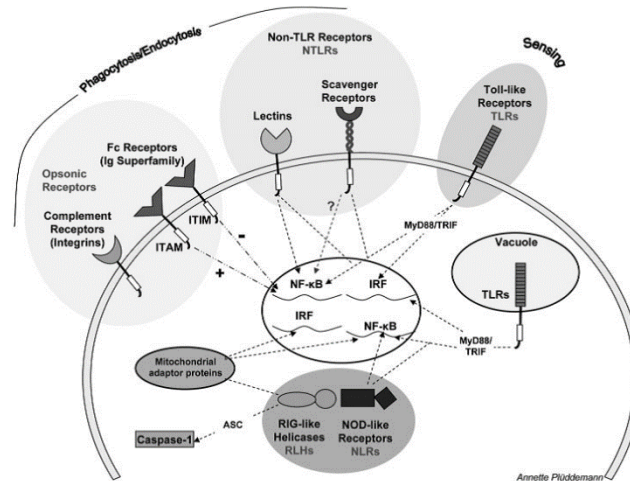
Tumorski makrofagi (engl. *tumor associated macrophages*, TAM) vrše supresiju antitumorske aktivnosti (Mosser i Edwards, 2008). Iako postoje značajne razlike među tipovima makrofaga, svi oni imaju imunosupresivnu aktivnost kada se aktiviraju (Murray i Wynn, 2011). Kada su stimulisani, makrofagi menjaju svoje fenotipske karakteristike pri čemu ili promovišu ili inhibiraju antimikrobnu aktivnost, antitumorski imunitet i inflamatorni odgovor. Prema različitim istraživanjima (Rutschman, 2001; Mylonas i sar., 2009; Kawanishi i sar., 2010) makrofagi pokazuju fleksibilnu funkciju, pri čemu prelaze sa jednog funkcionalnog fenotipa na drugi kao odgovor na varijabilne signale mikrookoline.

Makrofagi koji se ne uključuju u procese zapaljenja najveći deo svoje populacije održavaju lokalnom proliferacijom. Kao najbolji primer lokalne proliferacije makrofaga Ajami i sar. (2007) i Mildner i sar. (2007) navode mikroglija ćelije mozga, dok neki drugi autori opisuju istu pojavu i kod alveolarnih makrofaga (Sawyer i sar., 1982; Tarling i sar., 1987; Landsman i sar., 2007), metalofilnih i makrofaga bele pulpe slezine (Wijffels i sar., 1994) i Kupferovih ćelija jetre (Crofton i sar., 1978).

Mada makrofagi na mestima zapaljenja imaju kapacitet da se dele, samo mali broj populacije makrofaga nastaje *de novo*, i kao takvi, oni nastaju diferencijacijom monocita krvi. Inflamatorne materije dovode do brze migracije monocita u inflamirano tkivo.

Ostaje sasvim nejasno da li se krvni monociti integrišu na isti način u mrežu lokalnih makrofaga kao makrofagi nastali lokalnom proliferacijom (Nahrendorf i sar., 2007; Arnold i sar., 2007; Swirski i sar., 2009).

Kao i svi fagociti, i monociti i makrofagi imaju veliki broj membranskih receptora čiji broj varira od tkiva u kome se nalaze i aktivacionog statusa (Stafford i sar., 2002; Gordon, 2007). Na osnovu funkcionalnih kategorija, mogu se podeliti na različite kategorije kao što su adhezioni receptori, receptori fagocitoze, receptori faktora rasta, receptori diferencijacije, receptori aktivacije, migracioni receptori i receptori funkcije. Međutim, jedan receptor može imati više funkcija. Prema Stafford-u i sar. (2002) najvažnije grupe receptora uključuju Fc receptore, „toll-like” receptore, receptore glavnog kompleksa tkivne histokompatibilnosti (MHC receptori), receptore citokina, receptore hemokina i „scavenger” receptore (slika 2.8). Isti autori navode da su Fc receptori monocita i makrofaga oni koji se nalaze i na granulocitima, ali i trombocitima. Na monocitima i makrofagima se nalaze četiri tipa receptora koji vezuju C3 fragmente komplementa (Weiss i sar., 2004) od kojih prvi receptor (CD35) vezuje C3bi komponentu komplementa (Wright i sar., 1998). Ostala tri receptora komplementa pripadaju integrinskoj familiji receptora i uključuju CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18 receptore. Interakcija ovih receptora sa komponentama komplementa inicira fagocitozu i u nešto manjem obimu aktivira ćelije. Neki od integrinskih receptora se nalaze na svim leukocitima, dok se CD11c nalazi uglavnom na monocitima i makrofagima (Moore i sar., 2006).



Slika 2.8. Prikaz najvažnijih grupa receptora makrofaga (Gordon, 2007)

Monociti i makrofagi vrše ekspresiju „*toll-like*” receptora (TLR) 1, 2, 4, 5, 6 i 10 na svojim membranama. Unutar samih ćelija nalaze se receptori TLR 3, 7 i 9 na membrani endozoma makrofaga, dok se na membrani endozoma monocita nalazi samo TLR 9. Od TLR na ćelijama monocitno-makrofagnog sistema najbolje je izučavan TLR 4 koji prepoznaje lipopolisaharide (LPS) gram negativnih bakterija (Noss i sar., 2001). Na ćelijama monocitno-makrofagnog sistema (MMS) nalaze se i manosa receptori koji omogućavaju vezivanje bakterija, gljivica i parazitskih mikroorganizama i glavna uloga im je uloga u fagocitozi (Stafford i sar., 2002). Iako su makrofagi koji vode poreklo od monocita slični monocitima, dobijeni rezultati govore u prilog činjenici da poseduju veću moć fagocitoze *Mycobacterium paratuberculosis* kod goveda (Woo i sar., 2006). Iako mehanizam razlike između monocita i makrofaga nije sasvim jasan, Myones i sar. (1988) smatraju da tokom sazrevanja, odnosno diferentovanja monocita u makrofage dolazi do povećane ekspresije CR4 (receptor komplementa 4) i da stoga postoji razlika u fagocitnoj sposobnosti između makrofaga i njihovih prekursora monocita.

U zavisnosti od stimulacije koji su dobili, makrofagi reaguju imunostimulativno ili imunosupresivno (Maxie, 2007). Klasično aktivisanje makrofaga je pod uticajem dve vrste signala. Prema Nathan (1991) obligatorni signal je interferon gama (IFN γ) koji priprema makrofage za aktivaciju, ali on sam ne može izvršiti njihovu aktivaciju. Drugi signal je tumor nekrotični faktor (TNF) ili „*inducer*” tumor nekrotičnog faktora. Egzogeni TNF može imati ulogu drugog signala, međutim jedini fiziološki relevantan sekundarni signal za aktivaciju makrofaga je TNF koji stvaraju sami makrofagi nakon vezivanja mikroorganizama za njihove

toll-like receptore (TLR). Dakle, klasično aktivisani makrofagi (M1 makrofagi) se razvijaju pod uticajem IFN γ uz sadejstvo sa mikrobnim delovanjem, odnosno najčešće vezivanjem bakterijskog lipopolisaharida (LPS) za površinu makrofaga. Aktivirani M1 makrofagi luče proinflamatorne citokine, imaju povećanu ekspresiju MHC antigena i kostimulatornih molekula na površini membrane, pojačanu endocitoznu funkciju i sposobnost eliminisanja patogena.

Glavna uloga makrofaga je sprečavanje replikacije unutarćelijskih patogena (Stafford i sar., 2002). Kao takvi, makrofazi su kritična karika u borbi protiv mikroorganizama kao što su oni iz rodova *Legionella*, *Mycobacterium*, *Leishmania*, *Rhodococcus*, *Toxoplasma*, *Listeria*, *Brucella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella*, *Rickettsia* i *Theileria*. Nakon fagocitoze patogena makrofagi ih ubijaju, razlože složene proteine, vežu ih za MHC II antigen i transportuju na površinu ćelije gde ih prezentuju drugim ćelijama imunog sistema, a pre svega T limfocitima. Veliki broj virulentnih mikroorganizama interferira sa procesom fagocitoze čime se slabi imunski odgovor. Noss i sar. (2001) zapažaju da virulentne mikobakterije interferiraju sa antigenskom prezentacijom tako što inhibiraju stvaranje fagolizozoma, sprečavaju aktivaciju proteolitičkih enzima u fagozomu i menjaju ekspresiju MHC I i MHC II molekula, ali i koregulatornih proteina.

Makrofage, aktivisane na klasičan način, najčešće karakteriše produkcija azotnog oksida (NO), koja se obavlja samo uz prisustvo lipopolisaharida (LPS) (MacMicking i sar., 1997; Hibbs, 2002). Biološka funkcija aktivisanih makrofaga je dobro poznata.

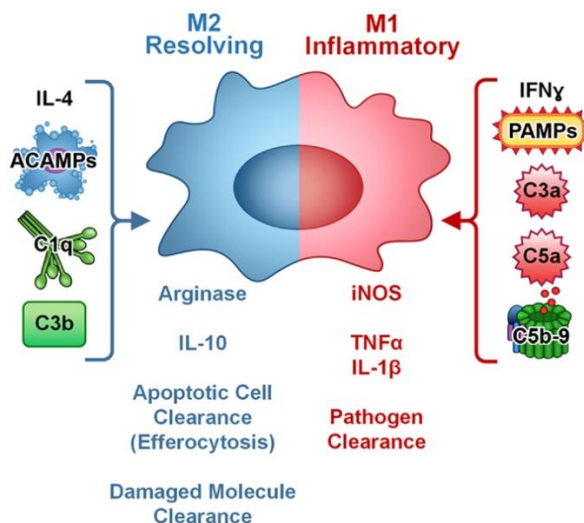
Aktivisani makrofagi migriraju do mesta zapaljenja gde dolaze u kontakt sa patogenima, koje ubijaju i razgrađuju. Nasuprot uvreženom mišljenju, aktivirani makrofagi nisu ništa značajniji kao fagociti nego druge ćelije koje poseduju takvu sposobnost (Mosser i Handman, 1992). Iako aktivirani makrofagi pokrivaju veću površinu tkiva u inflamaciji i imaju veću moć pinocitoze, njihova ekspresija manoza receptora i Fc receptora za IgG (Fc γ R) je smanjena (Ezekowitz i Gordon, 1984). Međutim, aktivisani makrofagi imaju značajno povećanu sposobnost ubijanja mikroorganizama i njihove degradacije, što postižu povećanom produkcijom toksičnih kiseonikovih vrsta i indukcijom inducibilnog NO sintaza gena (iNOS) radi produkcije NO. Restrikcija esencijalnih nutritivnih materija unutar fagozoma je važan aspekt ubijanja mikroorganizama koji koriste makrofagi. Restrikcija gvožđa (Gruenheid i

Gros, 2000) i triptofana (Carlin i sar., 1989) je dobro poznat mehanizam limitiranja unutarćelijskog rasta u aktiviranim makrofagima.

Gordon i sar. (1992) su dokazali da određeni broj makrofaga vrši ekspresiju svojih receptora pod uticajem interleukina 4 (IL-4). Ovi autori su zaključili da makrofagi tretirani sa IL-4 pokazuju fenotip alternativne aktivacije. Ovaj fenotip makrofaga se aktivira na drugačiji način nego klasično aktivisani M1 makrofagi. Goerdts i Orfanos (1999) utvrđuju da ovaj tip makrofaga ima drugačiju biološku funkciju nego klasično aktivisani makrofagi i ovakve makrofage označavaju regulatornim, odnosno M2 makrofagima.

Regulatorni makrofagi ne proizvode azotni oksid (NO) (Ruhmstcan i sar., 2001) i nemaju sposobnost ubijanja patogena. Iako ove ćelije vrše ekspresiju MHC II molekula, imaju smanjenu sposobnost prezentovanja antigena i u mnogim slučajevima vrše supresiju proliferacije T limfocita. M2 makrofagi luče citokine kao što su: interleukin 10 i antagonist receptora interleukina 1. Smatra se, da u plućima, ovakvi makrofagi regulišu inflamatorni odgovor (Goerdts i sar., 1999). Takođe je dokazano da M2 makrofagi učestvuju u angiogenezi, stimulaciji zarastanja rana i depoziciji ekstracelularnog matriksa (ECM). Regulatorni makrofagi luče velike količine fibronektina i proteina matriksa (Gratchev i sar., 2001) čime stimulišu fibrogenezu u fibroblastoidnim ćelijama (Song i sar., 2000). Indukcija arginaze kod ovih makrofaga dovodi do biosinteze poliamina i prolina, stimulacije rasta i razvoja ćelija, formiranja kolagena i remodeliranja tkiva (Hesse i sar., 2001).

M2 makrofazi imaju i antiinflamatornu aktivnost i mogu se podeliti u tri grupe: M2a, koje aktiviraju IL-4 ili IL-13; M2b, koje aktiviraju imuni kompleksi u kombinaciji sa IL-1 β ili lipopolisaharidima i M2c koje aktivira IL-10, TGF- β ili glukokortikosteroidi. Za razliku od M1 makrofaga, koji stimulišu T_h1 limfocite putem sekrecije IL-12, M2 makrofagi podstiču razvoj T_h1 imunskog odgovora sekrecijom IL-10 (slika 2.9).



Slika 2.9. Uloga M1 i M2 makrofaga
(<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00402/full>)

Makrofagi imaju centralnu ulogu u uklanjanju starih ili oštećenih eritrocita i ćelija oštećenih tkiva. Na mesto oštećenja, makrofage privlače signali koje generišu oštećene ćelije. Lizofosfatidil holin i neke druge supstance koje oslobađaju ćelije koje su ušle ili apoptozu ili nekrozu služe kao signal makrofagima, koji na mestu oštećenja tkiva fagocituju ćelijske ostatke ili cele ćelije. Posle toga oni lučenjem hemokina i citokina privlače druge ćelije inflamatornog odgovora i mijelofibroblaste (Leibovich i Wiseman, 1988).

Mantovani i sar. (2002) ukazuju na to, da je veliki broj tumorskih promena infiltrovan makrofagima i da postoji kompleksna veza između tumorskih ćelija i makrofaga. M1 makrofazi inhibiraju rast tumora oslobađanjem citotoksičnih supstanci kao što su TNF- α , radikali kiseonika i azotni oksid. Nasuprot tome, M2 makrofazi pospešuju rast neoplazmi promovišući angiogenezu i obnovu tkiva. Da li će makrofagi uticati na ubijanje tumorskih ćelija ili pomagati njihov razvoj zavisi od signala koji primaju.

Životni vek makrofaga zavisi od toga da li učestvuju u zapaljenjskom procesu ili ne. Tačan životni vek makrofaga nije tačno poznat ali prema nekim autorima (Ganz i Lehrer, 2006) može iznositi od 100 dana pa i više od godinu dana. Nasuprot tkivnim neaktivnim makrofagima, makrofagi koji učestvuju u imunskoj reakciji, isto kao i njihovi prekursori monociti predstavljaju kratkoživeće ćelije.

Makrofagi, iako veoma bitni za urođeni imunski odovor, često nisu dovoljni za značajnu stimulaciju specifičnog imunskog sistema, i ovakva specifična uloga pripada

specijalnim antigen prezentujućim ćelijama (APC) koje se nazivaju dendritične ćelije (DC). Dendritične ćelije su specijalizovane antigen prezentujuće ćelije koje se nalaze u svim organizmima (Banchereau i Steinman, 1998) i čija sposobnost obrade i prezentovanja različitih antigena ne može da se meri ni sa jednom vrstom ćelija. Sposobnost dendritičnih ćelija da indukuju snažan antigen specifični T limfocitni odgovor razlikuje ovu vrstu ćelija od ostalih antigen prezentujućih ćelija kao što su B limfociti ili makrofagi (Mellman i Steinman, 2001). Dendritične ćelije se nazivaju i profesionalne antigen prezentujuće ćelije, što se odnosi na njihovu sposobnost da indukuju aktivaciju T limfocita koji ranije nisu imali kontakt sa antigenom, tzv. virgiline (engl. *virgin, naive*) T limfocite. Za razliku od drugih antigen prezentujućih ćelija dendritične ćelije indukuju aktivaciju, proliferaciju i diferentovanje antigen specifičnih T limfocita (Banchereau i Steinman, 1998). Međutim, od stepena razvoja dendritičnih ćelija i njihovog tipa, direktno zavisi imunostimulatorna funkcija koju će ove ćelije imati (Jonuleit i sar., 2001; Kubach i sar., 2005). Dendritične ćelije predstavljaju kritičnu vezu između nespecifičnog i specifičnog imunskog odgovora (Pinchuk i sar., 2003). One efikasno regulišu kostimulatorne molekule i vrše ekspresiju molekula peptida MHC II i do 100 puta više nego bilo koja druga antigen prezentujuća ćelija (Banchereau i Steinman, 1998). Stoga je prema Palucka i Banchereau (1999) jedna dendritična ćelija sposobna da aktivira i 3000 virgilnih T limfocita.

Kod ljudi su opisana dva glavna tipa dendritičnih ćelija, mijeloidne i plazmocitoidne dendritične ćelije. Plazmocitoidne dendritične ćelije proizvode velike količine interferona alfa (IFN- α) prilikom virusnih infekcija (Soumelis i Liu, 2006) i veoma su značajne za antivirusni imunitet. Hadeiba i sar. (2008) ukazuju na veoma važnu ulogu CCR9 podtipa plazmocitoidnih dendritičnih ćelija u supresiji T limfocita i razvoju tolerancije. Međutim, tačna funkcija plazmocitoidnih dendritičnih ćelija u indukciji i regulaciji T limfocitnog odgovora još nije sasvim razjašnjena. Nasuprot tome, funkcija mijeloidnih dendritičnih ćelija, njihova diferencijacija od nezrelog prekursora ćelije kostne srži do imunostimulatorne dendritične ćelije nastale nakon medijacije specifičnih tkivnih faktora i „toll-like” receptora je dobro dokumentovana (Heufler i sar., 1988; Inaba i sar., 1992; Jonuleit i sar., 1997; Schuler i sar., 1997; van Vliet i sar., 2007).

Tokom protekle decenije, utvrđen je potencijal monocita da se diferenciraju u dendritične ćelije. Ranija istraživanja su dokazala da dendritične ćelije tokom inflamatorne reakcije zaista i vode poreklo od cirkulišućih monocita krvi (Steinman i Inaba, 1999). Osim

toga, skorija istraživanja (Bogunovic i sar., 2009; Varol i sar., 2009) ukazuju da i određene dendritične ćelije, koje se ne nalaze u području zapaljenja vode poreklo od cirkulišućih monocita krvi.

Međutim, utvrđeno je da transfer prečišćenih monocita nije uspeo da nadomesti ceo repertoar dendritičnih ćelija (Naik i sar., 2006). Stoga se monociti ne mogu smatrati apsolutnim prekursorima konvencionalnih (mijeloidnih) dendritičnih ćelija već prekursori samo određenih, specijalizovanih podtipova dendritičnih ćelija.

Zajednički prekursor monocita, makrofaga i dendritičnih ćelija je makrofag-DC progenitorska ćelija (MDP) kostne srži označena kao $Lin^- CX3CR1^+ CD11b^- CD115^+ cKit^+ CD135^+$ (Fogg i sar., 2006). Od ove ćelije, koja je nastala od zajedničke mijeloidne progenitor ćelije (engl. *common myeloid progenitor*, CMP), nastaju samo monociti, makrofagi i dendritične ćelije. Makrofag-dendritična ćelija (MDP) se diferentuje u zajedničku progenitorsku dendritičnu ćeliju (engl. *common DC-progenitor*, CDP) od koje nastaju dendritične ćelije ali ne i monociti i makrofagi (Liu i sar., 2009). Iako se i MDP i CDP nalaze jedino u kostnoj srži, prekursori dendritičnih ćelija nastali od CDP se mogu identifikovati kako u kostnoj srži, tako i u krvi, slezini i limfnim čvorovima i sačinjavaju ispod 0,05% leukocita u tim organima (Liu i Nussenzweig, 2010). Prema tome, prekursori dendritičnih ćelija (pre-DC) migriraju u limfoidna tkiva putem krvi i proliferišu i diferenciraju se u dendritične ćelije (Liu i sar., 2009).

Današnja podela dendritičnih ćelija je donekle kompleksna i one se mogu podeliti u dve grupe: mirujuće konvencionalne dendritične ćelije i nekonvencionalne dendritične ćelije (Shortman i Naik, 2007). Konvencionalne mirujuće dendritične ćelije imaju karakterističnu funkciju i oblik dendritičnih ćelija, dok nekonvencionalne dendritične ćelije nastaju kao odgovor na zapaljensku reakciju. Nekonvencionalne dendritične ćelije su do skoro uključivale plazmocitoidne dendritične ćelije i dendritične ćelije koje vode poreklo od monocita. Međutim, otkriće mirujućih dendritičnih ćelija koje vode poreklo od monocita (npr. dendritične ćelije *lamina propria* creva) u velikoj meri komplikuje dosadašnju podelu dendritičnih ćelija (Shortman i Liu, 2002; Shortman i Naik, 2007). Konvencionalnim dendritičnim ćelijama se mogu smatrati sve one dendritične ćelije nastale od pre-DC ćelija dok se nekonvencionalnim mogu smatrati one nastale od monocita kao i plazmocitoidne dendritične ćelije koje se značajno razlikuju u svojoj funkciji. Konvencionalne dendritične

ćelije se dalje mogu podeliti na migratorne i limfoidne dendritične ćelije. Migratorne DC imaju sposobnost migracije u periferna tkiva i limfoidne organe. Ove ćelije se mogu naći u koži (Langerhansove i dermalne DC), plućima, gastrointestinalnom sistemu, jetri i bubrezima. Limfoidne DC se nalaze u limfoidnim organima kao što su limfni čvorovi, slezina i timus i nadalje se mogu podeliti na osnovu ekspresije CD4 i CD8 molekula (Kushwah i Hu, 2011). Prema Renjifo i sar. (1997), 0,1 - 07% perifernih mononuklearnih ćelija krvi goveda su identifikovane kao dendritične ćelije. González-Cano i sar. (2014) su identifikovali dve subpopulacije cirkulišućih dendritičnih ćelija goveda. Ovi autori su utvrdili fenotipski različite CD205^{Hi} i CD205^{Lo} subpopulacije mijeloidnih dendritičnih ćelija koje imaju isti kapacitet vezivanja antigena, dok CD205^{Lo} ima veću sposobnost aktiviranja T limfocita. Takođe, autori ovog istraživanja su utvrdili da postoje značajne razlike u ekspresiji CD40, CD80 i CD86 molekula ovih dendritičnih ćelija pri interakciji sa T limfocitima.

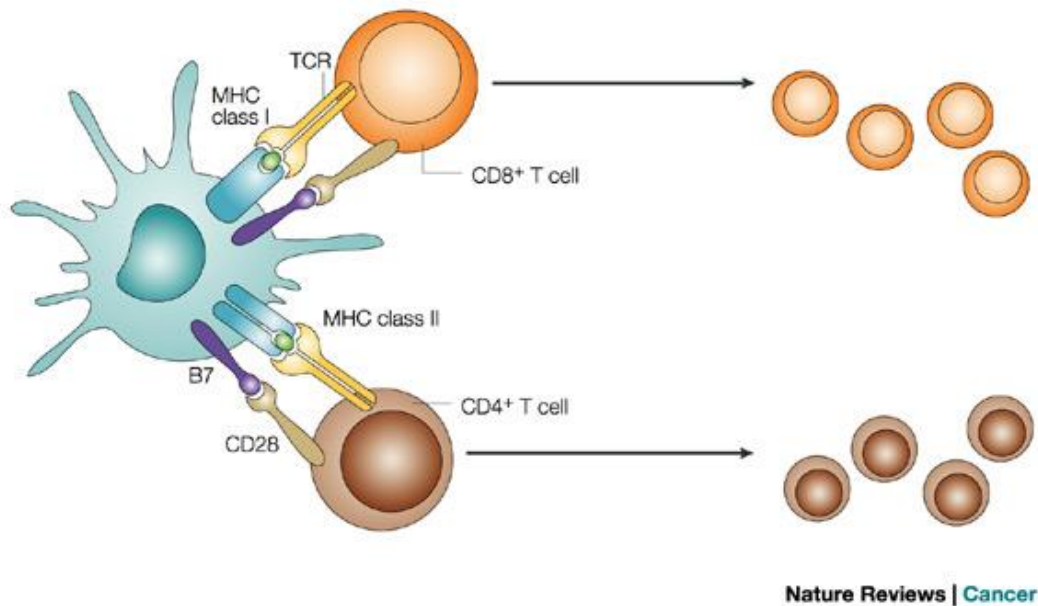
Dendritične ćelije su "stražari" imunskog sistema i kao takve su strateški postavljene na mestima gde patogeni mikroorganizmi prodiru u telo. One mogu da fagocituju cele ćelije, uključujući i nekrotične ćelije, ćelije u fazi apoptoze ali takođe mogu i da preuzimaju antigene od živih ćelija za prezentaciju citotoksičnim T limfocitima (Harshyne i sar., 2001). Receptori koji se nalaze na dendritičnim ćelijama, a koji učestvuju u fagocitozi patogena uključuju: FcγR CD32 i FcγR CD64, receptore za IgE FcεRI i FcεRII (CD23), receptore za IgA FcαR CD89 (Geissmann i sar., 2001), receptore komplementa CD11b i CD11c, C-lektinski tip manan receptora CD205 i „scavenger” receptore za apoptične ćelije CD36 (Hart, 1997; Larsson i sar., 2001).

Nakon kontakta sa patogenom, dendritične ćelije ga fagocituju, obrađuju i prenose do limfoidnih organa. Obrada antigena unutar dendritičnih ćelija se odvija preko dva glavna puta, egzogenog (endozomalnog) i endogenog (proteozomalnog). Egzogeni antigeni se unose u endozomalne odeljke gde se vrši njihova degradacija. Peptidni fragmenti antigena se vezuju za MHC II klasu molekula unutar MHC II bogatih endozomalnih odeljaka (MIIC). MHC II peptidni lanci se sintetišu u endoplazmatskom retikulumu (ER) gde se vezuju za konstantne lance (invarijantne, Ii) koji sprečavaju da peptid-vezujuća pukotina MHC II molekula bude prerano popunjena sopstvenim proteinima (Castellino i Germain, 1995). Kompleks MHC II/Ii se dalje prenosi iz ER do Goldži kompleksa a odatle dalje vezikulama do MIIC. U MIIC se vrši proteolitičko razlaganje Ii pri čemu samo u pukotini ostaje mali peptidni fragment CLIP (Shi i sar., 2000). Nakon vezivanja CLIP peptida antigeni peptidi fagocitovanih patogena se

vezuju za MHC II molekule (Morris i sar., 1994) nakon čega se kompleks MHC II/antigeni peptid izbacuje u egzocitnim vakuolama kroz citoplazmu do površine ćelije.

Da bi dendritične ćelije prezentovale endogene antigene citotoksičnim (citolitičnim) CD8⁺ T limfocitima (CTL) ovi antigeni se moraju razgraditi u proteozomima uz pomoć „*heat shock*” proteina (HSP) koji imaju ulogu šaperona, nakon čega se peptidni antigeni prenose do ER uz pomoć transportnog antigen procesora (TAP) (Pamer i Cresswell, 1998). U ER, novosintetisani MHC Ia lanci formiraju kompleks sa β₂ mikroglobulinom, nakon čega se kompleks MHC I/β₂M transportuje u egzocitnim vakuolama do membrane dendritične ćelije (Rescigno i sar., 1999). Migratorna funkcija je nešto što je jedinstveno za dendritične ćelije. Nakon fagocitoze patogena DC vrše ekspresiju hemokinskog receptora za limfne čvorove CCR7 koji omogućava ulazak ovih ćelija u limfne sudove i migraciju do limfnih čvorova na kojima se nalaze CCL19 i CCL21, ligandi za CCR7 (Randolph i sar., 2005). Gunn i sar. (1999) su još ranije uvdili da je kod osoba kojima nedostaju geni za CCL19 i CCL21 poremećena migracija dendritičnih ćelija.

U limfnim čvorovima, dendritične ćelije prezentuju antigen CD4⁺ helper T limfocitima čime aktiviraju specifičan imunski odgovor. Prema Hivroz i sar. (2012), da bi se aktivirali citotoksični CD8⁺ T limfociti potrebna je kooperacija sa aktiviranim CD4⁺ helper T limfocitima (T_h) ili istovremena aktivacija „*toll-like*” receptora. Da bi dendritične ćelije ćelije aktivirale T limfocite, one moraju sazreti do dolaska u limfni čvor. Medijatori njihovog sazrevanja su proinflamatorni citokini kao što su TNF-α, ali i TLR i CD40L (Sallusto i Lanzavecchia, 1994). Kapacitet dendritičnih ćelija da aktiviraju T limfocite zavisi od tri vrste signala (Reis i Sousa, 2006). Prvi signal je vezivanje MHC/antigen kompleksa za receptor T limfocita (TCR). Drugi signal je kostimulacija koja nastaje vezivanjem CD80/86 molekula za CD28 molekul na T limfocitima. Prva dva signala su dovoljna za specifični imunski odgovor, odnosno T limfocitnu klonalnu ekspanziju i diferencijaciju efektorskih ćelija (slika 10). Trećim signalom, dendritične ćelije utiču na sudbinu aktiviranih T limfocita. Ukoliko dendritične ćelije luče interleukine 12 (IL-12) i IFN-γ onda dolazi do diferencijacije T limfocita u T_h1 limfocite i indukcije citotoksične aktivnosti CD8⁺ T limfocita (Joffre i sar., 2012).



Slika 2.10. Prikaz aktivacije T limfocita od strane dendritične ćelije (<http://www.nature.com>)

2.2.3. Polimorfonuklearni leukociti (granulociti)

Polimorfonuklearni leukociti imaju važnu ulogu u zapaljenjskoj reakciji, kako u uništavanju patogenih mikroorganizama tako i u regulaciji imunske reakcije (Geering i sar., 2013). Granulociti su prva linije ćelijske odbrane nespecifičnog imunskog odgovora.

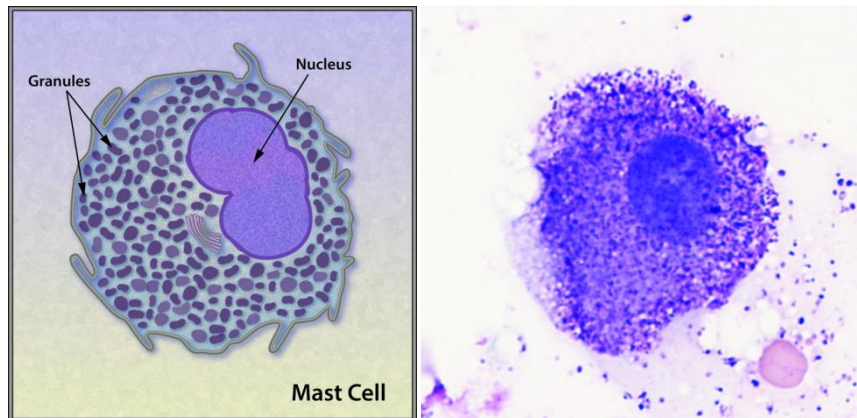
Na osnovu ranijeg, klasičnog modela hematopoeze multipotentna progenitorska ćelija kostne srži je smatrana za prekursor zajedničkih mijeloidnih (CMP) i limfoidnih (CLP) progenitorskih ćelija (Manz i sar., 2002). Međutim, novim modelom, odnosno modelom revizije hematopoeze utvrđeno je da neutrofilni granulociti vode poreklo od limfoidno-mijeloidne progenitorske ćelije dok eozinofilni i bazofilni granulociti vode poreklo od eritroidno-mijeloidne progenitorske ćelije (eozinofilno-bazofilnih progenitora, EoBP) koja nema potencijal stvaranja neutrofilnih granulocita (Gorgens i sar., 2013).

Granulociti imaju heterogene citoplazmatske granule koje sadrže ćelijski specifične unutarćelijske enzime, sintetisane receptore, katjonske proteine i druge specifične molekule. Na osnovu bojenja citoplazmatskih granula, polimorfonuklearni leukociti se mogu klasifikovati u tri različite populacije: neutrofilni granulociti (Ne), bazofilni granulociti (Bas) i eozinofilni granulociti (Eos). Citoplazmatske granule neutrofilnih granulocita se

prvenstveno boje neutralnim bojama, eozinofila kiselim bojama kao što je eozin, dok se granule bazofilnih granulocita boje baznim bojama i na osnovu afiniteta granula za boje ove ćelije su i dobile svoja imena. Mastociti (MC), ćelije slične granulocitima predstavljaju posebnu vrstu ćelija koje su efektori nespecifičnog imunskog Sistema, a čiji se zapaljenjski medijatori takođe nalaze u citoplazmatskim granulama. Međutim, za razliku od granulocita, ćelija koje cirkulišu u krvi, mastociti su ćelije koje se nalaze raspoređene u vaskularizovanim tkivima i seroznim šupljinama (Paul, 2013). Sadržaj citoplazmatskih granula mastocita i granulocita se oslobađa u kontaktu sa patogenima, odnosno antigenima. Proteini granula imaju različite funkcije: neki uništavaju patogene, neki regulišu funkcije ostalih leukocita dok neki učestvuju u remodeliranju tkiva.

2.2.3.1. Mastociti (*labrociti, mast ćelije*)

Mastociti vode poreklo od agranularne, pluripotentne, CD34⁺ matične ćelije kostne srži (Church i LeviSchaffer, 1997; Austen i Boyce, 2001). Utvrđeno je da se CD34⁺ c-kit⁺ i CD13⁺ prekursorske ćelije pod uticajem specifičnih faktora rasta diferenciraju u mastocite (Kierszenbaum, 2007).



Slika 2.11. Mastocit na krvnom razmazu (Callahan i Ya, 2014)

Razvitak, opstanak i diferencijacija mastocita zavise od faktora rasta matičnih ćelija (engl. *stem cell factor* - SCF) koji stvaraju endotelne i epitelne ćelije, fibroblasti, a koji inhibiraju GM-CSF, IFN- γ i TGF- β (Ito i sar., 2012). Prema Krishnaswamy i sar. (2006) za razvoj normalnih mastocita je kritičan molekularni signal koji nastaje kao rezultat interakcije između SCF i c-kit. Isti autori naglašavaju da mastociti koji nisu pod uticajem SCF ulaze u spontanu apoptozu, dok mutacija u c-kit dovodi do stvaranja c-kit protoonkogena, mastocitoze i posledične neoplazije ovih ćelija. Pod uticajem SCF i ostalih faktora rasta,

prekursori mastocita napuštaju kostnu srž i kod sisara se ove ćelije nalaze u cirkulaciji kao CD34⁺ c-kit⁺ i CD13⁺ mononuklearne ćelije (Dvorak i Monahan, 1985). Nakon dejstva različitih interleukina, kao što su interleukin 3, 4, 9 i 10 (IL-3, IL-4, IL-9 i IL-10) prekursori mastocita migriraju u vezivno tkivo (Kitamura i sar., 1987) i u *lamina propria* mukoze u kojima proliferišu, diferenciraju se, sazrevaju i akumuliraju karakteristične citoplazmatske granule (Church i Levi-Schaffer, 1997; Scott i sar., 2000). Formirani mastociti su ćelije prečnika 20 µm, ovoidnog ili nepravilnog izduženog oblika, okruglog jedra i sadrže veliki broj citoplazmatskih metahromatskih granula koje se tako boje zbog velike količine sulfatnih proteoglikana (heparin i hondroitin sulfat) (slika 2.11). Mastociti su strateški raspoređeni pored krvnih sudova, nerava i ispod epitela kože i mukoznih membrana, a njihova najveća koncentracija je na mestima kontakta organizma sa spoljašnjim faktorima okoline. Oni imaju važnu ulogu u akutnim zapaljenjskim reakcijama (Soter, 1983).

Mastociti, ali i bazofilni granulociti, učestvuju u reakcijama preosetljivosti koje karakteriše vazodilatacija, povećana vaskularna propustljivost, bronhokostrikcija, povećana sekrecija mukusa i stimulacija nerava. Iako najpoznatija, uloga mastocita u reakcijama hipersenzibilnosti nije njihova jedina uloga u imunskom odgovoru. Mastociti takođe vrše modulaciju imunog odgovora stimulacijom T limfocita i učestvuju u odbrani od parazitskih infekcija. Oni indukuju akutni i hronični inflamatorni odgovor stimulacijom migracije leukocita, adhezije leukocita i endotela krvnih sudova i učestvuju u procesima angiogeneze, depozicije fibrina, proliferacije fibroblasta i fibrozi. Osim u reakcijama preosetljivosti, mastociti se smatraju jednim od ključnih ćelija u imunskom odgovoru, inflamaciji, remodeliranju tkiva, fibrozi i koagulaciji (Magro i sar. 1988)

Mastociti vrše ekspresiju različitih TLR, a sama ekspresija ovih receptora zavisi od tipa mastocita i mesta na kome se nalaze (Vliagoftis i Befus, 2005). Osim ekspresije TLR, mastociti regulišu migraciju, sazrevanje i funkciju ostalih ćelija nespecifičnog imunskog odgovora kao što su neutrofilni granulociti i dentritične ćelije. Citokini koje luče mastociti (TNF α i IL-1) omogućavaju migraciju i sazrevanje dentritičnih ćelija (Cumberbatch i sar., 2000). Osim citokina, Mazzoni i sar. (2006) naglašavaju uticaj egzozoma (ćelijskih vezikula) mastocita na sazrevanje dendritičnih ćelija. Tumor nekrotični faktor alfa i superoksidni joni koje oslobađaju aktivirani mastociti stimulišu migraciju neutrofilnih granulocita na mesto zapaljenja (Barret, 1994).

Mastociti su takođe i antigen prezentujuće ćelije (APC) jer vrše ekspresiju MHC I molekula i stimulišu T limfocite na antigen specifičnu klonalnu ekspanziju i polarizaciju prema T_h1 ili T_h2 imunskom odgovoru (Mekori i sar., 1999; Henz i sar., 2001). Takođe, prema Merluzzi i sar. (2010), mastociti učestvuju u stimulaciji proliferacije i sinteze IgA.

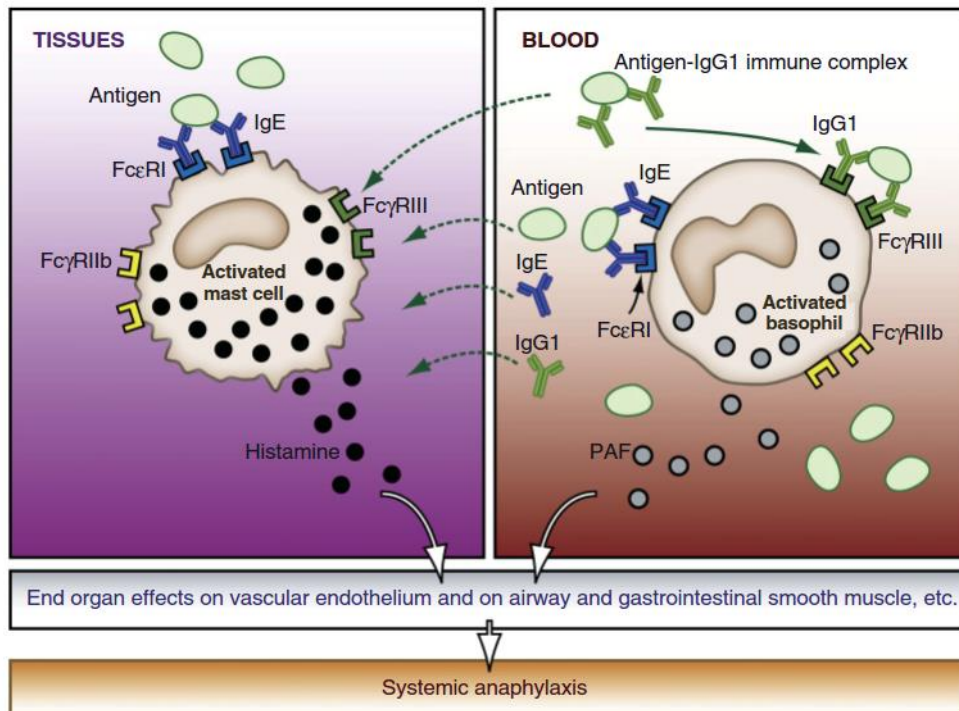
Na površini mastocita, kao i na površini njihovih ekvivalenata u cirkulaciji-bazofilnih granulocita, nalaze se specifični FcεRI receptori, visokog afiniteta prema imunoglobulinima E klase (ε lancima). Kod zdravih ljudi i životinja, molekuli imunoglobulina E klase značajno variraju u svojoj specifičnosti prema antigenima (Tizard, 2013). Nasuprot tome, kod atopičnih jedinki, IgE koji se vezuju za mastocite i bazofilne granulocite specifično vezuju samo jedan ili eventualno nekoliko različitih antigena. Nedostatak varijabilnosti IgE nakon izlaganja specifičnim antigenima rezultira u vezivanju ovakvog antigena za dva i više IgE, aktivaciju većeg broja FcεRI receptora i brzu aktivaciju i degranulaciju mastocita.

Visok nivo ekspresije FcεRI receptora postoji samo kod mastocita i bazofilnih granulocitima, čime se može objasniti uloga ovih ćelija u alergijskoj reakciji. Kod ljudi, znatno niži nivo ekspresije ovih receptora imaju i Langerhansove ćelije, periferne dendritične ćelije i monociti. Ovi receptori kod mastocita i bazofilnih granulocita imaju tetramernu strukturu koja se sastoji od IgE vezujućeg alfa lanca, jednog beta lanca i dva identična gama lanca, povezana disulfidnim vezama (Blank i sar., 1989). Sve ostale ćelije, osim mastocita i bazofilnih granulocita, poseduju FcεRI receptor u obliku trimera koji se sastoji od jednog alfa i dva gama lanca (Benhamou i sar., 1990).

Agregacija FcεRI receptora, koji su aktivirani od strane IgE, je dovoljna za transdukciju signala koji uključuje fosforilaciju tirozina i aktiviranje mastocita i bazofilnih granulocita, dok beta lanac FcεRI ima ulogu pojačivača signala (Paolini i sar., 1991; Parravicin i sar., 2001).

Nakon stimulacije, dolazi do degranulacije mastocita i oslobađanja postojećih medijatora reakcije koju prati oslobađanje medijatora koji se stvaraju i nakon aktivacije mastocita. Vazoaktivni amini, proteaze, heparin, interleukin 4 (IL-4), TNF-α i granulocitno-makrofagni faktor stimulacije (engl. *granulocyte-macrophage colony - stimulating factor*, GM-CSF) se oslobađaju odmah nakon stimulacije mastocita, dok punu aktivaciju prati oslobađanje novostvorenih medijatora kao što su faktor aktivacije trombocita (engl. *platelet-*

activating factor, PAF), derivata arahidonske kiseline i različitih citokina (Abbas i sar., 2015) (slika 2.12).



Slika 2.12. Imunska reakcija i oslobađanje medijatora anafilaktičke reakcije (Weiss i Wardrop, 2010)

Aktivacija i degranulacija mastocita dovodi reakcije preosetljivosti (hipersenzitivnosti) kao i migracije bazofilnih granulocita u područje aktivacije mastocita i posledično pojačanje ovakve reakcije (Bochner i Schleimer, 2001). Oslobađanje svih ovih supstanci indukuje migraciju neutrofilnih granulocita i makrofaga, povećanu vaskularnu propustljivost, sekreciju mukusa, povećanu pokretljivost gastrointestinalnog trakta, bronhokonstrikciju i druge simptome alergijske reakcije, odnosno anafilakse (Metcalf, 2008).

Produkti aktivacije komplementa, neke supstance kao što su otrovne materije nekih životinja, određeni neuropeptidi, kao i neki fizički insulti (mehaničke povrede, toplota i hladnoća) mogu da aktiviraju mastocite nezavisno od imunoglobulina E klase. Vezivanje bakterijskih komponenti za TLR 1, 2, 4 i 6 i druge specifične receptore kao što je CD48 može takođe da dovede do degranulacije mastocita.

Utvrđeno je da parazitske infekcije creva (npr. *Trichinella spiralis*) ali i ektoparaziti (npr. krpelji) i jednoćelijski paraziti (*Plasmodium*) dovode do povećanog broja mastocita

(McDermott i sar., 2001; Furuta i sar., 2006). Aktivacija ovih mastocita doprinosi eliminaciji nekih nematoda iz gastrointestinalnog trakta aktiviranjem himaze mMCP-1 (Knight i sar., 2000).

Nakon degranulacije, mastociti preživljavaju i ponovo obnavljaju sadržaj granula - regranuliraju. Smatra se, da se zbog toga, u slučajevima hroničnih infekcija može uočiti povećan broj mastocita.

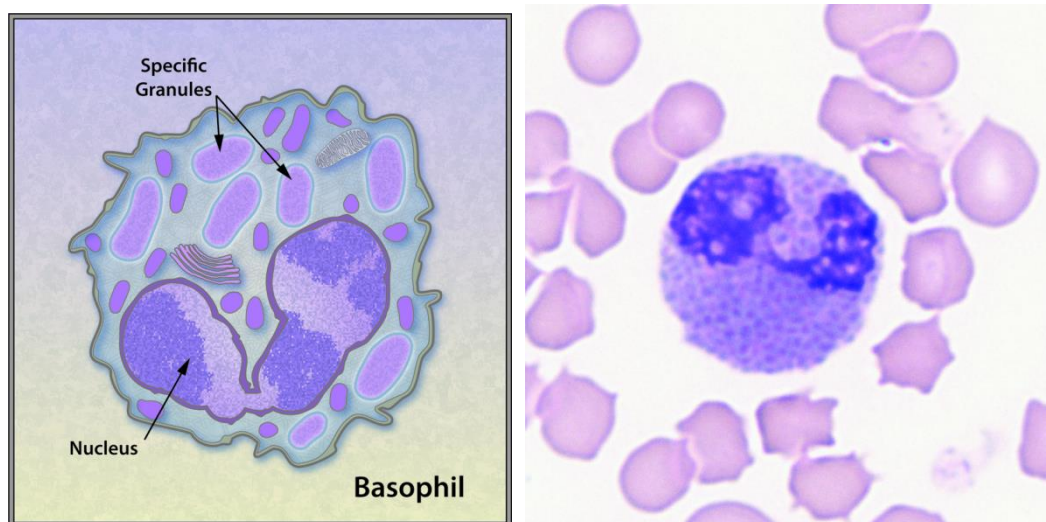
2.2.3.2. Bazofilni granulociti (bazofili)

Bazofilni granulociti su definitivno diferencirani granulociti koji vode poreklo od CD34+ Fcg c-kit- pluripotentnih progenitorskih ćelija kostne srži (Kirshenbaum i sar., 1992). Bazofilni granulociti su najmanje zastupljena populacija leukocita krvi i sačinjavaju samo 0,5 % ukupnih leukocita. Bazofilni mijelociti se mogu identifikovati u kostnoj srži standardnim hematološkim bojenjima. Proces diferencijacije i sazrevanja od progenitorske ćelije do zrelog bazofilnog granulocita se odvija u kostnoj srži i traje 2,5 dana (Dvorak i Monahan, 1985). U krvi, bazofilni granulociti cirkulišu veoma kratko, pri čemu je njihovo vreme poluživota od 6 časova do 2 dana (Falcone i sar., 2006; Ohnmacht i Voehringer, 2009), mada mogu opstati i do 2 nedelje u onim tkivima u kojima obavljaju inflamatornu ulogu (Hirai i sar., 1997).

Bazofilni granulociti su prečnika 5-8 μm , sadrže gust, segmentiran nukleusni materijal i lako se mogu uočiti bojenjem baznim bojama kao što je toluidin plavo (slika 13). Za razliku od veoma sličnih mastocita, bazofilni granulociti imaju mali proliferativni kapacitet i sadrže manji broj granula, iako su one većeg promera. Bazofilni granulociti vrše ekspresiju različitih receptora za citokine (IL-3R, IL-5R, GM-CSFR), receptora za hemokine (CCR2 i CCR3), receptora za komplement (CD11b, CD11c, CD35 i CD88), receptora za prostaglandine (CRTH2), receptore za imunoglobuline (Fc ϵ RI i Fc γ RIIb) i TLR (Metz i sar., 2008; Schroeder, 2009). Osim toga, bazofilni granulociti vrše ekspresiju i MHC I i CD86 molekula na membrani što im omogućava prezentovanje antigena CD8⁺ limfocitima nakon čega se oni diferenciraju u IL-10 produkujući fenotip (Kim i sar., 2009).

Interleukin 3 (IL-3) je glavni faktor rasta i efektorski citokin za bazofilne granulocite. On stimuliše stvaranje, diferenciranje i opstanak bazofilnih granulocita *in vitro* i reguliše

gotovo sve njihove funkcije (Schroeder i sar., 1995). Ostali faktori koji utiču na produkciju i diferentovanje bazofilnih granulocita su GM-CSF, IL-5, SCF, IL-4, ali i neki drugi citokini.



Slika 2.13. Bazofilni granulocit goveda (Callahan i Ya, 2014)

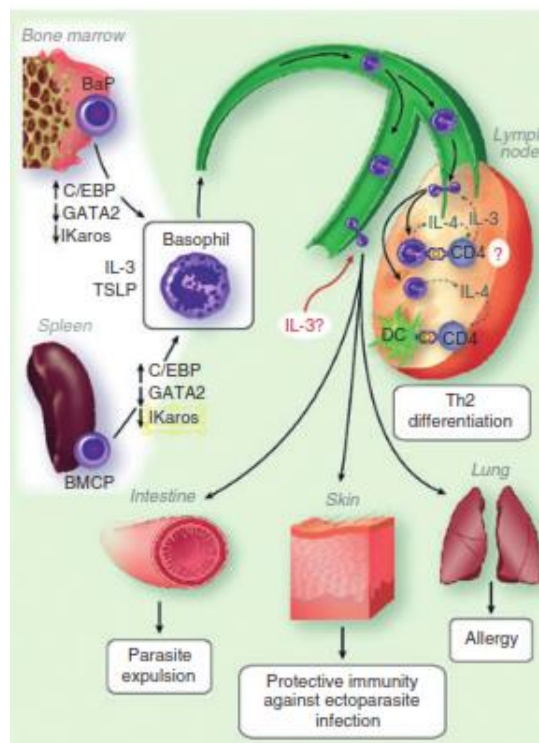
Duži niz godina, uloga bazofilnih granulocita je bila enigma, kako u vezi njihove uloge u imunskom odgovoru tako i u pogledu specifičnosti patogena koji može da dovede do njihove reakcije (Ben-Sasson i sar., 1990; Min i sar., 2004). Osim ovoga, Min i sar. (2012) ukazuju na funkcionalnu enigmatiku kratkog života bazofilnih granulocita i značajno poklapanje funkcija sa mastocitima tkiva. Kao i mastociti, bazofilni granulociti vrše ekspresiju receptora za IgE i oslobađaju sličan spektar hemijskih medijatora nakon povezivanja više receptora sa multivalentnim molekulom IgE.

Najznačajniji pomak u shvatanju funkcije bazofilnih granulocita je nastao nakon otkrića da su oni primarni izvor IL-4 *in vivo* (Min i sar., 2004; Voehringer i sar., 2004). Smatra se da se nakon iniciranja antigenom, CD4 T limfociti diferenciraju u T helper 2 (T_H2) efektorske ćelije uz pomoć IL-4 iz mikrookoline (Zhu i sar., 2010). CD4 limfociti, koji i sami stvaraju IL-4, moraju da prođu proces diferencijacije da bi izlučivali ovaj interleukin (Bird i sar., 1998). Nasuprot njima, bazofilni granulociti, odmah nakon aktivacije luče IL-4, a to se dešava čak i kod prekursora bazofilnih granulocita (Le Gros i sar., 1990).

Agregacija FcεRI receptora za koje je vezan multivalentan IgE molekul dovodi do aktivacije bazofilnih granulocita, egzocitoze granula i oslobađanja medijatora. Komponente komplekta C3a i C5a takođe aktiviraju bazofilne granulocite. Interleukini 3 i 5, GM-CSF, faktor oslobađanja histamina (HRF) kao i neki drugi hemokini stimulišu bazofilne

granulocite na pojačanu degranulaciju i povećenu sekreciju IL-4 i IL-13 nakon njihove aktivacije, iako sami nemaju sposobnost aktivacije bazofilnih granulocita (Vercelli, 2009). Interleukin 33 (IL-33) i „*toll-like*” receptori 2 i 4 (TLR2 i TLR4) se takođe nalaze na bazofilnim granulocitima. Njihova aktivacija dovodi do sekrecije IL-4 i IL-13 i povećanja potencijala IgE indukovane aktivacije i degranulacije (Pecaric-Petkovic i sar., 2009).

Bazofilni granulociti imaju važnu ulogu u tipu 1 alergijske reakcije, odnosno u anafilaktičkoj reakciji (Sokol i sar., 2008) (slika 2.14). Nakon ulaska u tkivo, IgE se vezuju za bazofilne granulocite nakon čega dolazi do degranulacije i oslobađanja medijatora alergijske reakcije (Wynn, 2009). Istraživanja Casolaro-a i sar. (1990), potvrđuju ulogu bazofilnih granulocita u alergijskim reakcijama kao što su alergijski rinitis, konjuktivitis i gastritis, urtikarija, astma i u alergijskim reakcijama nakon unošenja lekova ili ujeda insekata. Iako je njihov fagocitni potencijal veoma nizak, protektivna funkcija odbrane od helminata je jedna od najznačajnijih uloga bazofilnih granulocita (Murphy i sar., 2007). Utvrđeno je da se ova funkcija odnosi uglavnom na stimulaciju T_H2 imunskog odgovora i u odsustvu bazofilnih granulocita ovakva T_H2 imunska reakcija izostaje.



Slika 2.14. Uloga bazofilnih granulocita u imunskom odgovoru (Min i sar., 2012)

Kao i kod mastocita, medijatori koje proizvode bazofilni granulociti se mogu podeliti na one koji se već nalaze u granulama pre njihove aktivacije, novosintetisane medijatore nakon aktivacije i citokine (MacGlashan, 2009). Pre aktivacije bazofilnih granulocita, u njihovim granulama se u najvećoj meri nalazi histamin u kompleksu sa proteoglikanima, najčešće hondroitin sulfatom od koga se odvaja nakon egzocitoze. Granule bazofilnih granulocita sadrže manje heparina nego granule mastocita, dok je nivo triptaze iako varijabilan, uglavnom na nižem nivou nego što je to slučaj kod mastocita. Nakon aktivacije, bazofilni granulociti veoma brzo proizvode leukotrijen C4 (LTC4) i njegove proteolitičke proizvode leukotrijen D4 (LTD4) i leukotrijen E4 (LTE4). Sva tri leukotrijena su veoma moćni bronhokonstriktori i u velikoj meri povećavaju vaskularnu propustljivost. Nakon ulaska alergena, bazofilni granulociti proizvode proteazu granzim B pod uticajem IL-3 (Tschopp i sar., 2006).

2.2.3.3. Eozinofilni granulociti (eozinofili)

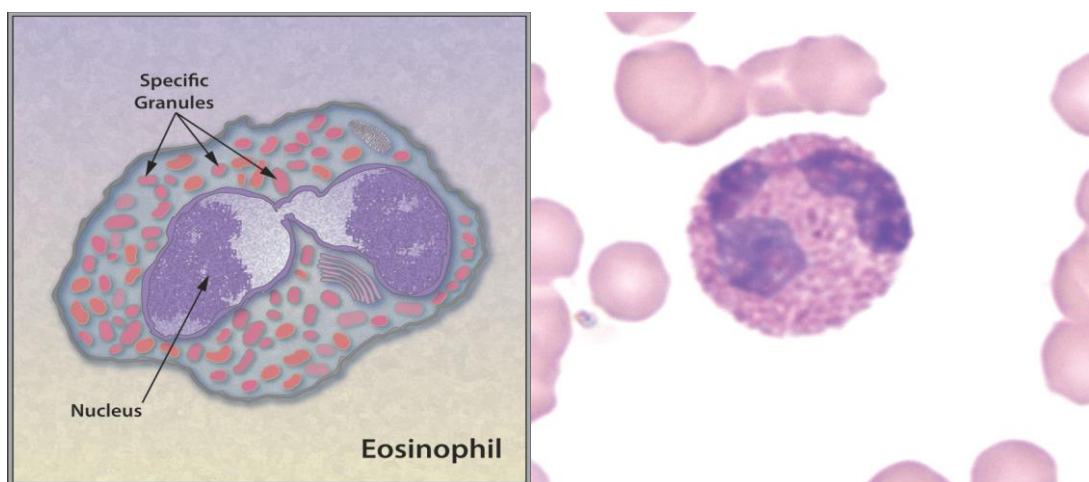
Eozinofilni granulociti su multifunkcionalni, proinflamatorni i imunoregulatorni leukociti uključeni u različite imunske procese i patogenezu različitih oboljenja kao što su parazitske infekcije, tumori, astma, atopija i osetljivost na lekove (Rothenberg, 1998).

Eozinofilni granulociti nastaju od progenitorske ćelije kostne srži i njihov razvoj se završava u samoj kostnoj srži, dok se u nešto manjem obimu kod nekih laboratorijskih vrsta životinja sazrevanje nastavlja i u timusu, slezini, plućima i limfnim čvorovima (Young i sar., 1997; Elsas, 2007). Prema Boyce i sar. (1995) multipotentna progenitorska ćelija daje ćeliju mijeloidne loze koja se razvija u mijeloblast od koga se diferencuju i bazofilni i eozinofilni granulociti.

T helper limfociti tipa 2 (T_H2), koji sekretuju interleukin 5 (IL-5) i interleukin 3 (IL-13) su najvažniji regulatori svih faza razvoja i funkcija eozinofilnih granulocita, uključujući njihovu povećanu produkciju u kostnoj srži na koju utiče IL-5 i odlazak u tkiva pod uticajem eotaksina koju reguliše IL-13 (Yamaguchi i sar., 1991). Eozinofilni granulociti se diferencuju i sazrevaju u kostnoj srži tokom 2-6 dana, u zavisnosti od vrste životinja. U kostnoj srži oni sačinjavaju manje od 10% ćelija, dok odnos eozinofilnih granulocita kostne srži prema eozinofilnim granulocitima krvi varira i može biti od 300:1 (kod morskog praseta) pa sve do 3,4:1 kod ljudi. Vreme razvoja novih eozinofilnih granulocita se značajno smanjuje kod infestacije parazitskim nematodama kao što je to slučaj kod infekcije *Trichinella* vrstama

(Herndon i Kayes, 1992). Eozinofilni granulociti ulaze u krv kao fenotipski zrele ćelije i nakon toga, ukoliko postoji odgovarajući stimulus, najčešće IL-5 ili eotaksični hemokini, odlaze u tkiva. Eozinofilni granulociti kod većine životinja sačinjavaju 0,1-3% ukupnih leukocita krvi. U krvi se eozinofilni granulociti zadržavaju veoma kratko, oko 1 čas kod psa pa do 18-24 časa kod ljudi (Steinbach i sar., 1979), a zatim migriraju u timus, pluća ili u gastrointestinalni trakt u kome se nalaze u homeostatskom stanju mirovanja (Lamousé-Smith i sar., 2006). U tkivima, životni vek eozinofilnih granulocita najčešće iznosi oko 2 dana, osim ukoliko nisu pod uticajem anti-apoptskog eozinofilnog faktora kao što je IL-5 kada im se životni vek može produžiti i do 2 nedelje. U nekim patološkim stanjima eozinofilni granulociti mogu ponovo da se vrate u perifernu cirkulaciju (Dale i sar., 1976). Lokalizacija koncentrisanih eozinofilnih granulocita i njihov broj variraju od životinjske vrste, stadijuma polnog ciklusa, ishrane i sadržaja histamina u tkivima. Ipak se generalno može reći da je najveći broj eozinofilnih granulocita skoncentrisan u gastrointestinalnom traktu gde odlaze pod uticajem hemokina eotaksina-1 (CCL11) (Matthews i sar., 1998; Mishra i sar., 1999).

Zreli eozinofilni granulociti su ćelije prečnika oko 15 μm , dvosegmentnog jedra, čija je citoplazma ispunjena velikim granulama koje se lako boje eozinom i na osnovu toga je ovaj tip granulocita i dobio ime (Hirsch, 1980) (slika 2.15). Višestruko segmentirana jedra, slična jedrima neutrofilnih granulocita su retka kod eozinofilnih granulocita (Archer, 1963). Slično neutrofilnim granulocitima, lipidna tela se mogu naći i kod eozinofilnih granulocita (Weller i sar., 1991).



Slika 2.15. Eozinofilne granule i dvostruko segmentirano jedro eozinofilnih granulocita (Callahan i Ya, 2014)

Citoplazma eozinofilnih granulocita sadrži tri tipa granula, specifične granule, primarne granule i male guste granule tzv. sombrero vezikule (EoSV) (Melo i sar., 2008), lipidna tela, mitohonrije, slobodne ribosome, nerazvijen endoplazmatski retikulum (ER), mali Goldži aparat i glikogen (Dvorak i sar., 1991; Bainton, 2008).

Specifične granule sadrže potentne citotoksične proteine i ovaj tip granula zauzima najveći deo citoplazme eozinofilnih granulocita. Specifične granule imaju dvodelnu strukturu kod velikog broja vrsta životinja (majmuna, mačaka, koza, zečeva, miševa, pacova) i ljudi (Weiss i Wardrop, 2010). Granule eozinofilnih granulocita ljudi sadrže četiri (4) glavna proteina: glavni bazni protein (engl. *major basic protein* - MBP), eozin peroksidazu (EPO), eozinofilni katjonski protein (engl. *eosinophil cationic protein* - ECP) i eozinofilni neurotoksin (engl. *eosinophil-derived neurotoxin*, EDN) (Rosenberg i sar., 2013).

Glavni bazni protein (MBP) sačinjava preko 50% proteina granula eozinofilnih granulocita i depoziti ovog proteina se mogu naći u tkivima na mestima gde nema zapaljenjske reakcije. Eozinofilni granulociti ekspiriraju dva homologa gena: MBP1 i MBP2. MBP1 je mali protein koji se sastoji od 117 aminokiselina, molekulske mase 13,8 kD (Hamann i sar., 1991). Zreli eozinofilni granulociti nemaju sposobnost transkripcije informacione RNK (mRNK) koja kodira MBP1, ukazujući na to da se ovaj protein koji se nalazi u kristaloidnim granulama sintetisao pre sazrevanja ćelija (Popken-Harris i sar., 1998; Voehringer i sar., 2007). Prema Plager-u i sar. (2006) ekspresiju MBP2 proteina jedino vrše eozinofilni granulociti i ovaj protein je specifičniji marker eozinofilnih granulocita nego MBP1.

U različitim istraživanjima (Ackerman i sar., 1985; Butterworth, 1984; Gleich, 1986; Gleich i Adolphson, 1986) je potvrđena toksičnost glavnog baznog proteina (MBP) prema parazitskim helmintima na osnovu koje se i bazira jedna od najvažnijih uloga eozinofilnih granulocita. Wasmoen i sar. (1988) smatraju da se toksičan efekat MBP zasniva na povećanju propustljivosti membrane ćelija usled interakcije MBP sa površinskim lipidnim dvoslojem membrane. Prema istim autorima, MBP2 ima dvostruko više pozitivnog naelektrisanja nego MBP1 i time se objašnjava njegov manji biološki potencijal u *in vitro* uslovima.

Eozinofilna peroksidaza (EPO) je protein koji se nalazi u matriksu granula eozinofilnih granulocita i sastoji se od dve subjedinice, teškog lanca od 50-57 kD i lakog lanca od 11-15 kD. Genetska sekvenca ovog proteina ima 68% podudarnosti sa sekvencom

mijeloperoksidaze neutrofilnih granulocita (MPO). EPO sačinjava oko 25% ukupne proteinske mase specifičnih eozinofilnih granula. Ona je katalizator oksidacije halida, pseudohalida i azotnog oksida pri čemu se stvaraju reaktivne vrste kiseonika, reaktivni azotni metaboliti i peroksi-nitratu slični oksidansi. Na ovaj način se na ciljnim ćelijama izaziva oksidativan stres i posledična ćelijska smrt koja nastaje nakon apoptoze ili nekroze (Agosti i sar., 1987; Wu i sar., 1999; MacPherson i sar., 2001). Rosenberg i Domachowske (2001) kao i Wang i Slungaard (2006) su dokazali antivirusno, antibakterijsko i antiparazitsko delovanje eozinofilne peroksidaze.

Eozinofilni katjonski protein (engl. *eosinophil cationic protein* - ECP) je mali protein koji se nalazi u matriksu eozinofilnih specifičnih granula i ima citotoksičnu, helmintotoksičnu i ribonukleaznu aktivnost (Rosenberg i Domachowske, 2001). On ispoljava određenu heterogenost koja je posledica različite glikolizacije. Gleich i Adolphson (1986) su identifikovali dve izoforme ovog proteina, ECP-1 i ECP-2. Na osnovu DNK i aminokiselinske analize, Slifman i sar. (1989) su utvrdili da ECP ima značajan stepen homologije sa eozinofilnim neurotoksinom (engl. *eosinophil-derived neurotoxin* - EDN). ECP pokazuje antivirusno dejstvo stvarajući pore u membranama ciljnih ćelija (Gleich i Adolphson, 1986; Rosenberg i Domachowske, 2001). Takođe, ovaj protein poseduje i različite netoksične funkcije kao što su supresija T limfocitnog proliferativnog odgovora i sinteze imunoglobulina od strane B limfocita, stimulacija degranulacije mastocita i sinteze glikozaminoglikana u fibroblastima (Venge i sar., 1999).

Eozinofilni neurotoksin je sekretorni protein ribonukleazne i antivirusne aktivnosti (Rosenberg i sar., 2013). Dokazano je da ovaj protein indukuje migraciju i sazrevanje dendritičnih ćelija (Yang i sar., 2003; Yang i sar., 2004). Yang i sar. (2008) takođe utvrđuju da se aktivacija mijeloidno dendritičnih ćelija odigrava nakon vezivanja EDN za TLR 2. Isti autori naglašavaju ulogu EDN u povećanju antigen specifičnog T_H2 imunskog odgovora.

U granulama eozinofilnih granulocita konja su izolovana četiri bazna proteina, koji u određenoj meri mogu biti analozi proteinima utvrđenim kod ljudi (Piller i Portmann, 1993). Ostali konstituenti specifičnih granula eozinofilnih granulocita uključuju katalaze, peroksizmalni lipid B, β glukuronidazu, katepsin D, serin piruvat aminotransferazu, kiselu fosfatazu, aril sulfatazu i cink (Dvorak i Ackerman, 1991; Jacobsen i sar., 2007).

Primarne granule, koje su vezane za membranu se nalaze u velikom broju kod progranulocita, ali se kod nekih vrsta životinja mogu naći u eozinofilnim granulocitima svih stadijuma zrelosti. Ove granule karakteriše lizofosfolipazna aktivnost koja je vezana za Charcot-Leyden-ove kristalne proteina (CLCP) koji sačinjavaju 7-10% ukupnih proteina u eozinofilnim granulocitima. Hogan i sar. (2008) naglašavaju da uloga CLCP nije sasvim razjašnjena, mada se zna da lizofosfolipaza blokira proces inflamacije tako što sprečava stvaranje metabolita arahidonske kiseline (Gleich i sar., 1993).

Treći tip granula eozinofilnih granulocita, male guste granule, sadrže kiselu fosfatazu, arilsulfatazu, ECP, katalazu i peroksidazu. Lipidna telašca eozinofilnih granulocita su depo arahidonske kiseline u esterifikovanoj formi koja služi za generisanje lipidnih medijatora kao što su leukotrieni i prostaglandini (Dvorak i Ackerman, 1991). Eozinofilni granulociti takođe sintetišu i najmanje 35 citokina (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18, TGF- α/β), hemokina (RANTES, eotaksin-1) i faktora rasta kao i proteoglikane, vitamin B vezujuće proteine, veliki broj enzima uključujući i kolagenazu, histaminazu, fosfolipazu D i esteraze (Hogan i sar., 2008). U nekim patološkim stanjima kao što je astma, eozinofilni granulociti su najveći proizvođači citokina kao što je TGF- β . Plazma membrana eozinofilnih granulocita sadrži NADPH oksidazu kojom se generiše oksidativni prasak i alkalnu fosfatazu kod nekih vrsta kao što su goveda, konji, psi i mačke (Jain, 1986). Eozinofilni granulociti ne sintetišu baktericidne supstance kao što su lizozim, laktoferin i fagocitin (Ayhan i sar., 1992).

Eozinofilni granulociti imaju veliki broj površinskih receptora, uključujući receptore za citokine, hemokine, komponente komplementa, imunoglobuline, adhezione molekule, lipidne medijatore, enzime i signalne i faktore apoptoze (Zimmermann i sar., 2000). Ovi granulociti imaju karakteristike antigen prezentujućih ćelija i sposobni su da fagocituju, procesuiraju i prezentuju antigene peptide u kompleksu sa MHC II molekulima, kao i da vrše kostimulaciju T limfocita ekspresijom molekula kao što su CD80, CD86 i CD40 i da fizički komuniciraju sa CD4⁺ T limfocitima (Spencer i Weller, 2010).

Rezultati velikog broja istraživanja objašnjavaju stimulaciju eozinofilnih granulocita na oslobađanje citotoksičnih proteina iz granula, pri čemu su svakako najvažniji citokini T_h2 limfocita IL-5, IL-4 i IL-13 (Horie i sar., 1997). Prema Valerius i sar. (1990) i IFN- γ T_h1 limfocita učestvuje u aktivaciji eozinofilnih granulocita, međutim daleko sporije nego što to čine citokini T_h2 limfocita. Utvrđeno je da i neki citokini epitela kao što su IL-33 i timusni

stromalni limfopoetin (TSLP) utiču na adheziju, stvaranje i degranulaciju eozinofilnih granulocita (Cherry i sar., 2008). Takođe i direktna aktivacija nekih TLR kao što su TLR1, TLR4, TLR7, TLR9 i TLR10 može da poveća aktivnost eozinofilnih granulocita i stimuliše njihovu degranulaciju (Nagase i sar., 2003).

Yousefi i sar. (2008) su dokazali sposobnost eozinofilnih granulocita da oslobađaju ekstracelularne dezoksiribonukleinske (DNK) mreže. Ovakav fenomen, koji je ranije opisan samo kod neutrofilnih granulocita, opisuje stvaranje DNK mreža sa antimikrobnom aktivnošću usled prisustva histona. Nakon kontakta sa bakterijama i sa C5a komponentom komplekta i CCR3 ligandom, eozinofilni granulociti veoma brzo oslobađaju mitohondrijalnu DNK, međutim, za razliku od neutrofilnih granulocita, eozinofilni granulociti ne umiru nakon oslobađanja ekstracelularnih mreža. Isti autori su utvrdili da ekstracelularne mreže eozinofilnih granulocita sadrže granule ECP i MBP koje im obezbeđuju antimikrobnu aktivnost, čime se potvrđuje značajna uloga eozinofilnih granulocita u nespecifičnom antibakterijskom imunskom odgovoru.

Iako su eozinofilni granulociti sposobni da vrše fagocitozu, parazitski helminti su previše veliki da bi bili fagocitovani, tako da ove ćelije luče medijatore koji se vezuju za njih. U sadejstvu sa perforinima T limfocita, eozinofilni granulociti napadaju larve parazitskih crva tako što oslobađaju bazne i hidrolitičke toksine, a zatim migriraju ispod kože oštećene larve (McEwen, 1992). Neka istraživanja ukazuju na mogućnost da eozinofilni granulociti imaju pre ulogu u sprečavanju reinfekcije nego u eliminisanju inicijalne infekcije (Hagan i sar., 1985).

2.2.3.4. Neutrofilni granulociti

Neutrofilni granulociti su prva linija odbrane protiv mikroorganizama, odnosno najznačajnija komponenta odgovora na bilo koji inflamatorni signal (Appelberg, 2006). Kombinacijom fagocitoze i oslobađanja biohemijskih antimikrobnih supstanci, neutrofilni granulociti predstavljaju kritičnu nespecifičnu odbranu protiv mikrobne invazije. Ove ćelije, specifično generisane za brz imunski odgovor su ključna komponenta nespecifičnog odgovora na invaziju patogena (Amulic i sar., 2012; Fournier i Parkos, 2012).

Aberantna aktivacija neutrofilnih granulocita dovodi do ciljanog toksičnog delovanja ovih efektor na ćelije sopstvenih tkiva (Martin i Leibovich, 2005). Stoga je sasvim jasno da struktura i funkcija neutrofilnih granulocita mora biti adaptirana i regulisana na način da

minimizira njihovo auto-destruktivno delovanje. U cirkulaciji zdravih jedinki neutrofilni granulociti se nalaze u stanju mirovanja čime se osigurava da njihov toksičan unutarćelijski sadržaj ne ošteti tkiva sopstvenog domaćina.

Neutrofilni granulociti su dugo smatrani kratko živećim efektorskim ćelijama nespecifičnog imunskog sistema koje poseduju samo ograničen kapacitet biosintetičke aktivnosti, čija je primarna uloga u akutnoj inflamaciji i uništavanju vanćelijskih patogena (Borregaard i sar., 2010). I zaista, u *in vitro* uslovima, neutrofilni granulociti preživljavaju tek nekoliko sati (Bratton i Henson, 2011). Međutim, Colotta i sar. (1992) su dokazali da neutrofilni granulociti nisu kratko živeće ćelije i da mogu da prežive značajno duže nego što se mislilo. Prema Pillay i sar. (2010), određivanje životnog veka neutrofilnih granulocita u *in vivo* uslovima komplikuje neodređenost njihovog boravka u kostnoj srži, pre ulaska u cirkulaciju. Ovi autori iznose podatke koji govore o dužini života neutrofilnih granulocita od 5 dana u cirkulaciji pre njihove apoptoze. Nasuprot kontroverze povodom dužine života neutrofilnih granulocita, svi autori se slažu da aktivacija produžava opstanak ovih ćelija i da neutrofilni granulociti u tkivima žive duže nego oni u cirkulaciji.

Neutrofilni granulociti vrše ekspresiju gena koji kodiraju medijatore inflamacije, uključujući i komponente komplementa, Fc receptore, hemokine i citokine (Cassatella i sar., 1999), a smatra se da luče i anti-inflamatorne molekule koji imaju ulogu u prekidanju zapaljenske reakcije.

Dugo se smatralo da neutrofilni granulociti poseduju samo ulogu fagocitnih ćelija, ulogu u oslobađanju litičkih enzima iz svojih granula i produkciju reaktivnih oksidativnih intermedijatora (ROS) u svom antimikrobnom potencijalu (Nathan i sar., 2006). Napredak u nauci i korišćenje visoko-tehnoloških metoda, pre svega izolacija prečišćenih kultura neutrofilnih granulocita (Pelletier i sar., 2010), obrada informacione RNK (mRNK) i izolacija proteina neutrofilnih granulocita (Kotz i sar., 2010) rezultirale su proširenom saznanju o transkripcionim događajima unutar samih neutrofilnih granulocita i posledično njihovim funkcijama.

2.2.3.4.1. Generisanje neutrofilnih granulocita

Sve ćelije imunskog sistema vode poreklo od pluripotentne matične ćelije kostne srži (Baum i sar., 1992). U ranoj fazi granulopoeze, ove hematopoetske matične (*stem*) ćelije se diferenciraju u mijeloblaste (Killmann i sar., 1962) koji su prekursori svih polimorfonuklearnih leukocita, odnosno granulocita (Cline, 1975). Na osnovu istraživanja kod ljudi, u kojima su prekursori neutrofilnih granulocita obeležavani radionuklidima (Warner i Athens, 1964), utvrđeno je da je za diferencijaciju mijeloblasta u mijelocit potrebno oko 7,5 dana, a za diferencijaciju mijelocita u zrele granulocitnu ćeliju oko 6,5 dana.

Granulocitna diferencijacija je regulisana koordinisanom ekspresijom ključnih mijeloidnih transkripcionih faktora, na osnovu kojih nastaju ćelije granulocitne i monocitno-makrofagne linije od zajedničke progenitorske matične ćelije. Transkripciona istraživanja ukazuju na to da neutrofilni granulociti nastaju kroz selektivnu ekspresiju različitih transkripcionih faktora (Egr1, HoxB7 i STAT3), proteina (S100A8, S100A9 i neutrofilne elastaze), receptora (za N-formil metionil-leucil-fenilalanin i granulocitno-makrofagni faktor stimulacije, GM-CSF) (Sasmono, 2007).

Populacija neutrofilnih granulocita u kostnoj srži se može podeliti na tri odeljka: odeljak matičnih ćelija, mitotski odeljak i post-mitotski odeljak. Odeljak matičnih ćelija se sastoji od nediferenciranih hematopoetskih matičnih ćelija (HSC), dok se u mitotskom odeljku nalaze opredeljene granulocitne progenitorske ćelije koje ulaze u proliferaciju i diferencijaciju. Potpuno diferencirani zreli neutrofilni granulociti sačinjavaju post-mitotski odeljak, koji čini rezervu neutrofilnih granulocita u kostnoj srži i oni mogu biti oslobođeni u cirkulaciju u svakom trenutku. Rezerva neutrofilnih granulocita u kostnoj srži ljudi se procenjuje na oko 6×10^{11} ćelija. Uzevši u obzir pretpostavku, da je potrebno 5 dana od stvaranja neutrofilnih granulocita u kostnoj srži do njihove pojave u krvi, lako se može preračunati količina od $1,7 \times 10^9$ ćelija/kg telesne mase neutrofilnih granulocita koja se stvori u toku dana (Donohue, 1958).

Sa kvantitativne strane, produkcija neutrofilnih granulocita je najznačajnija funkcija kostne srži. Otpilike dve trećine ćelija krvi, koje se stvore u kostnoj srži, pripadaju ćelijama bele krvne loze, od čega svakako najveći udeo (oko 60% svih ćelija) čine neutrofilni

granulociti. Produkcija neutrofilnih granulocita u kostnoj srži se konstantno održava i kod ljudi je ta produkcija oko 2×10^{11} ćelija dnevno.

Neutrofilni granulociti se stvaraju u kostnoj srži u procesu hematopoeze kao odgovor na stimulaciju određenim citokinima, pre svega G-CSF (engl. *granulocyte colony stimulating factor*) (Borregaard, 2010). Ukupan broj neutrofilnih granulocita u telu određuje njihov stepen stvaranja, deponovanje i mobilizacija iz kostne srži, opstanak ili eliminacija iz krvi i ulazak u tkiva tokom inflamatornog odgovora. Sposobnost organizma da kontroliše i održava balans između produkcije i eliminacije neutrofilnih granulocita sugerise da mora postojati neki molekularan proces koji „meri” broj neutrofilnih granulocita koji se u svakom trenutku nalaze u telu. Ovo postojanje takozvanog "neurostata" ostaje i dalje veoma kontroverzno pitanje (Bugl i sar., 2012). Međutim, isti autori naglašavaju da sve bolje razumevanje molekularnih mehanizama kontrole stvaranja neutrofilnih granulocita podržava teoriju povratne sprege u homeostazi broja ovih ćelija.

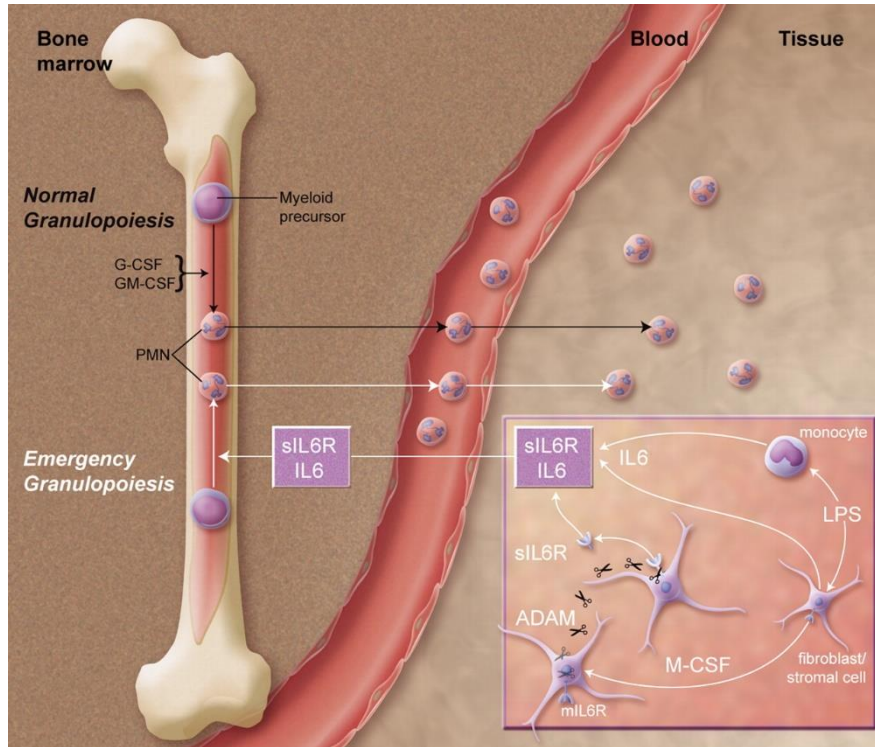
Najveći broj istraživanja mehanizama kontrole stvaranja neutrofilnih granulocita do sada je bio fokusiran na G-CSF ili GM-CSF kao jedine citokine koji utiču na produkciju neutrofilnih granulocita. Naravno, može se reći da je G-CSF i jeste esencijalan za održavanje odnosno kontrolisanje stvaranja neutrofilnih granulocita u određenim uslovima. On je glavni regulator fiziološke granulopoeze i njegovi efekti uključuju opredeljivanje progenitorskih ćelija za produkciju mijeloidne loze (Richards, 2003), proliferaciju granulocitnih prekursora, redukciju prelaska ćelija među odeljcima granulocita (Lord, 1989) i oslobađanje zrelih neutrofilnih granulocita iz kostne srži. G-CSF deluje preko G-CSF receptora koji pripadaju klasi 1 citokinskih receptora.

Međutim, mnogi autori smatraju ovakav sistem kontrole produkcije neutrofilnih granulocita veoma uprošćenim modelom. Tako, prema Lieschke i sar. (1994), G-CSF nije jedino odgovoran za produkciju neutrofilnih granulocita, jer je utvrđeno da kod miševa koji ne proizvode G-CSF dolazi do stvaranja neutrofilnih granulocita u meri koja iznosi 25% u odnosu na normalnu produkciju. Hibbs i sar. (2007) potvrđuju ovakav stav prethodno navedenih autora, utvrđujući u istraživanjima na miševima da miševi kojima nedostaju G-CSF i/ili GM-CSF imaju produkciju neutrofilnih granulocita koja iznosi oko 20% normalnog nivoa neutrofilnih granulocita.

Stvaranje neutrofilnih granulocita je u velikoj meri regulisano stepenom njihove apoptoze u tkivima. Kada makrofagi i dendritične ćelije fagocituju apoptične neutrofilne granulocite, oni luče interleukin 23 (IL 23) koji stimuliše specijalizovane T ćelije (neutrofil-regulatorne T ćelije) da luče interleukin 17 (IL 17). Ovi T limfociti koji regulišu stvaranje neutrofilnih granulocita se nalaze u mezenterijalnim limfnim čvorovima i prema Ley i sar. (2006) pripadaju grupi takozvanih gama-delta T ćelija i NK sličnim T ćelijama. IL 17 koji stvaraju ovi T limfociti je značajan stimulator produkcije G-CSF (Schwarzenberger i sar., 2000). Može se zaključiti da koncentracija G-CSF opada sa porastom broja neutrofilnih granulocita u tkivima.

Životinje koje su deficitarne u citokinima, odgovornim za produkciju neutrofilnih granulocita i dalje mogu stvarati veći broj neutrofilnih granulocita kao odgovor na inflamatorne stimulse u procesu koji se naziva vanredna, odnosno nužna granulopoeza (engl. *emergency granulopoiesis*) (Basu i sar., 2000) (slika 2.16).

Hematopoetski progenitori se mogu diferencirati i proliferirati u neutrofilne granulocite pod uticajem inflamatornog stimulusa, čak i u odsustvu citokina koji stimulišu granulopoezu, čime se potvrđuje teorija da i neki drugi signali učestvuju u kontroli produkcije neutrofilnih granulocita. Novija istraživanja (Takizawa i sar., 2012) jasno dokazuju da progenitorske ćelije proliferišu pod uticajem molekula patogena preko stimulacije TLR i Nod-like receptora. Tako lipopolisaharidi (LPS) gram-negativnih bakterija mogu direktno stimulisati proces vanredne granulopoeze indukcijom stvaranja interleukina 6 (IL-6) (Walker, 2008). Prema tome, kombinacija trošenja neutrofilnih granulocita u perifernim tkivima u procesu borbe protiv patogenih mikroorganizama i uticaj molekula koje oslobađaju ovi patogeni na progenitorske ćelije vodi do sinergističke stimulacije granulopoeze u vanrednim situacijama. U prilog ovoj teoriji govori i činjenica da "germ-free" miševi imaju izuzetno nizak nivo neutrofilnih granulocita (neutropenija), čak i niži nego miševi koji ne stvaraju G-CSF (Bugl i sar., 2013). Ovi autori zaključuju da je homeostaza neutrofilnih granulocita regulisana kompleksnim procesom njihove apoptoze i fagocitoze u perifernim tkivima, stvaranjem u kostnoj srži pod uticajem citokina i prisustvom patogenog (ili komensalnog) stimulusa.

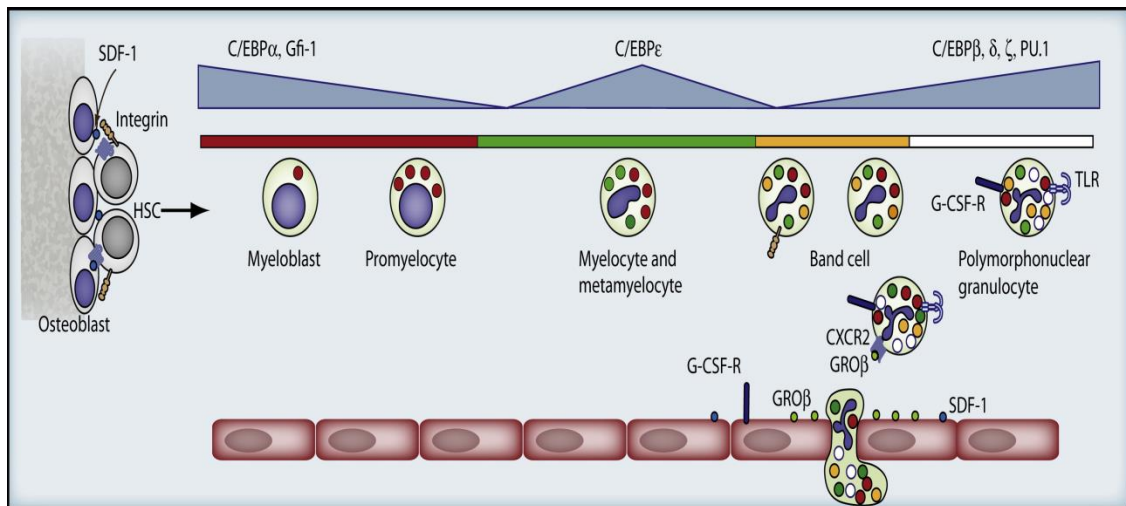


Slika 2.16. Normalna i vanredna granulopoeza (<http://www.bloodjournal.org>)

Hemokinski receptor CXCR4 je esencijalan za održavanje matičnih ćelija i zrelih neutrofilnih granulocita unutar kostne srži (Lapidot i Kollet, 2002). Ovi autori nalaze da CXCR4 vezuje CXCL12 (ranije stromalni faktor 1, engl. *stromal derived factor*, SDF1) čiju ekspresiju vrše stromalne ćelije kostne srži uključujući i osteoblaste i ćelije vaskularnog endotela kostne srži. Nedostatak CXCR4 dovodi do ubrzanog oslobađanja zrelih neutrofilnih granulocita iz kostne srži u cirkulaciju bez ikakvog uticaja na životni vek neutrofilnih granulocita u cirkulaciji (Eash i sar., 2009). Nasuprot tome, mutacije u CXCR4 genu dovode do kliničkog sindroma koji karakteriše nemogućnost oslobađanja neutrofilnih granulocita u cirkulaciju, nagomilavanje zrelih neutrofilnih granulocita u kostnoj srži i neutropenija (deficijencija neutrofilnih granulocita u cirkulaciji) (Hernandez i sar., 2003).

Drugi receptor, čiju ekspresiju vrše mijeloidne ćelije, a koji je važan za prelazak neutrofilnih granulocita iz kostne srži je CXCR2. Njegovi ligandi CXCL1 (KC) i CXCL2 (Groß, MIP-2) se nalaze na membrani endotelnih ćelija kostne srži (Eash i sar., 2010). Isti autori su utvrdili da nedostatak CXCR2 dovodi do fenotipske mijelokateksije sa retencijom odraslih neutrofilnih granulocita u kostnoj srži. CXCR4 je receptor nužan za održavanje nivoa neutrofilnih granulocita u kostnoj srži spremnih za mobilizaciju u krv. Oslobađanje

neutrofilnih granulocita se postiže stimulacijom receptora CXCR2, TLR ili G-CSFR (receptor za G-CSF) koji se svi pojavljuju tokom kasne faze sazrevanja neutrofilnih granulocita (Theilgaard-Monch i sar., 2005) (slika 2.17). Stimulacija nekog od ovih receptora ne dovodi do dodatnog oslobađanja neutrofilnih granulocita iz kostne srži ukoliko je CXCR4 odsutan, čime se dokazuje fundamentalna uloga CXCR4 u održavanju nezrelih i zrelih neutrofilnih granulocita u kostnoj srži (Eash i sar., 2009).



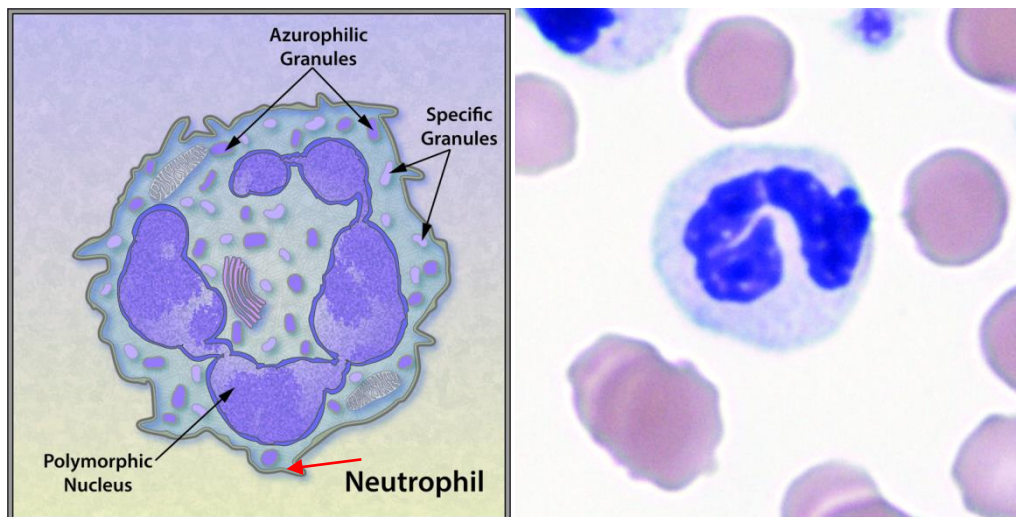
Slika 2.17. Granulopoeza i izlazak neutrofilnih granulocita iz kostne srži (Borregaard, 2010)

Ekspresija SDF-1 (CXCL12) na endotelnim ćelijama kostne srži je regulisana citokinom G-CSF, pri čemu on utiče na smanjenu ekspresiju ovog receptora. Nasuprot tome, G-CSF povećava ekspresiju CXCL1 (KC) i CXCL2 (Groβ, MIP-2). Na ovaj način G-CSF utiče na povećanu CXCR2 signalizaciju i posledično oslobađanje neutrofilnih granulocita u cirkulaciju (Christopher i sar., 2009; Eash i sar., 2010).

Da bi izašli iz kostne srži, zreli neutrofilni granulociti moraju da migriraju kroz sinusoidalni epitel koji odvaja hematopoetsko odeljenje kostne srži od cirkulacije. Neutrofilni granulociti migriraju kroz endotel kostne srži direktno kroz ćelije endotela u procesu koji se naziva transcelularna migracija (Burdon, 2008).

2.2.3.4.2. Struktura i biohemija neutrofilnih granulocita

Zreli, segmentirani neutrofilni granulociti su ćelije promera 10-12 μm na čijoj se površini elektronskom mikroskopijom može uočiti veliki broj malih pseudopoda (Bochsler i Slauson, 2002) (slika 2.18). Pseudopode značajno povećavaju površinu neutrofilnih granulocita što je esencijalno za njihovu fagocitnu ulogu (Paape i sar., 2003).



Slika 2.18. Pseudopodije (crvena strelica), granule i segmentirano jedro neutrofilnih granulocita - krvi razmaz (Callahan i Ya, 2014)

Zreli neutrofilni granulociti imaju reznjevito (segmentirano) jedro koje se uglavnom sastoji od heterohromatina i u čijem se centru nalazi mala količina euhromatina. Jedarce neutrofilnih granulocita se veoma retko može uočiti mikroskopijom dok se u jedru može naći mali broj nuklearnih pora (Bertram, 1985). Osim velikog broja granula, u citoplazmi neutrofilnih granulocita se nalazi manji broj organela kao što su mitohondrije, Goldži aparat, endoplazmatski retikulum, ali i varijabilan broj čestica glikogena. Tanak pojas na periferiji citoplazme neutrofilnih granulocita ne sadrži nikakve organele niti inkluzije, ali se u ovom pojasu nalaze proteini citoskeleta (Bertram, 1985).

Neutrofilni granulociti poseduju veliki broj različitih granula koje doprinose njihovoj osnovnoj ulozi: ubijanju bakterija, gljivica, protozoa i nekih virusa. Granule sadrže veliki broj proteina uključujući antimikrobne proteine, proteaze, komponente respiratornog praska kao i receptore za endotelijalne adhezivne molekule, ekstracelularne proteine matriksa, bakterijske komponente i rastvorljive medijatore inflamatorne reakcije (Faurischou i Borregaard, 2003). Deponovanje i egzocitoza proteina granula neutrofilnih granulocita moraju biti strogo kontrolisani kako bi se sprečila destrukcija sopstvenih tkiva (Ramaiah i Jaeschke, 2007).

Granule kao karakteristika svih granulocita (eozinofilnih, bazofilnih i neutrofilnih) predstavljaju depo proteina koji uništavaju mikroorganizme i vrše digestiju materija. Formiranje granula prati ceo proces tranzicije ćelije od mijeloblasta i promijelocita pa sve do stadijuma zrelog segmentiranog neutrofilnih granulocita. Formiranje granula (granulopoeza) počinje u stadijumu ranih promijelocita kada se nezrele transportne vezikule odvajaju od

Goldži kompleksa i međusobno fuzionišu (Bainton i Farquhar, 1965; Bainton i sar., 1971; Hartmann i sar., 1995). Nastale rane granule se mogu karakterisati visokim sadržajem mijeloperksidaze (MPO) i nazivaju se peroksidaza pozitivne granule, odnosno azurofilne granule zbog osobine da se lako boje baznom azur A bojom (Spicer i Hardin, 1969). Ove granule se takođe nazivaju i primarne granule. Nakon tranzicije iz promijelocita u mijelocite gubi se i mogućnost stvaranja MPO. Prema tome, sve granule koje nastaju nakon ovog perioda tranzicije nazivaju se peroksidaza negativne granule. Peroksidaza negativne granule mogu se na osnovu vremena generisanja i sastava podeliti na specifične (sekundarne) i želatinozne (tercijarne) granule. Specifične granule se stvaraju u stadijumu mijelocita i metamijelocita i sadrže visok nivo laktoferina i nizak nivo želatinaze, dok se želatinozne granule stvaraju u stadijumu između metamijelocita i zrelog neutrofilnih granulocita (takozvani *band* neutrofilni stadijum) i kod zrelih segmentiranih neutrofilnih granulocita (Kjeldsen i sar., 1993). Želatinozne granule sadrže visok nivo želatinaze i nizak nivo laktoferina (Borregaard i sar., 1995).

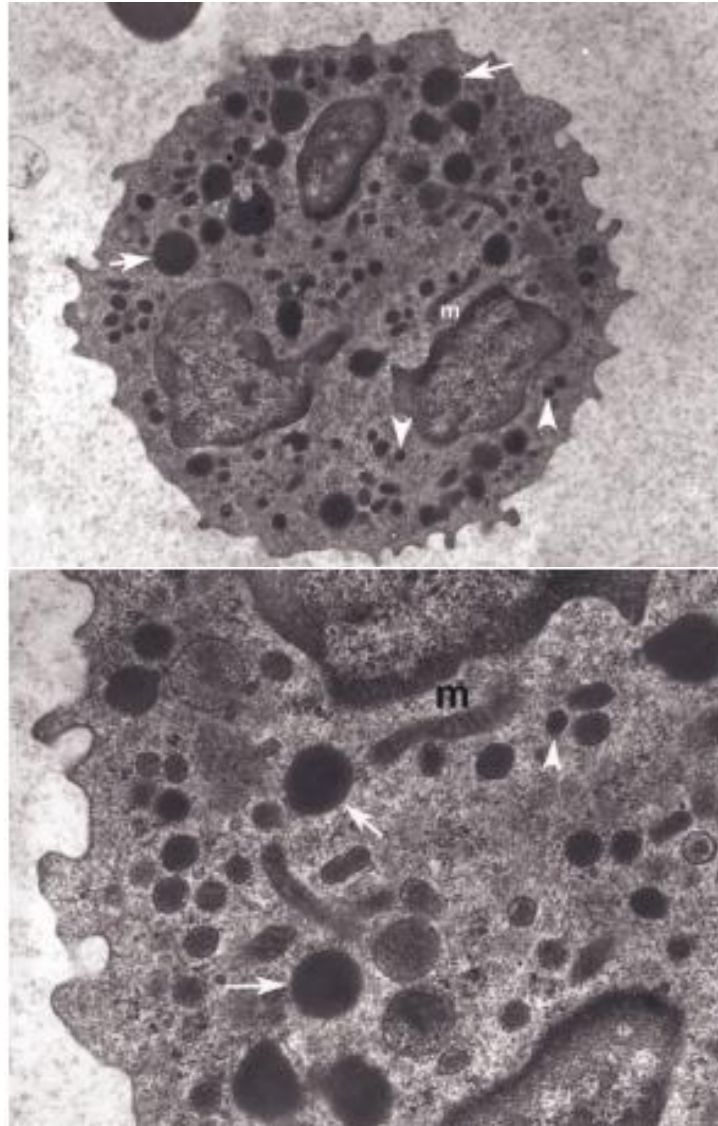
Lominadze i sar. (2005) naglašavaju da je podela granula neutrofilnih granulocita operativne prirode i da odražava sastav granula, dok prema Borregaard i Cowland (1997) ova podela pokazuje i razliku u mobilizaciji granula, pri čemu se granule koje se poslednje formiraju, u stvari prve oslobađaju. Međutim, prema nekim drugim autorima (Faurichou i sar., 2002; Udby i sar., 2002; Rørvig i sar., 2009) ova podela granula je veštačke prirode, jer se različiti tipovi granula mogu identifikovati na osnovu marker proteina. Zbog toga se klasična podela granula može objasniti mehanizmom vremena sinteze sastava granula (Le Cabec i sar., 1996). Proteini koji se sintetišu u neutrofilnim granulocitima nakon njihovog izlaska iz kostne srži nisu upakovani u granulama (Lapinet i sar., 2000; Theilgaard-Monch i sar., 2004) i mehanizam formiranja i nedostatak granula u ovom njihovom stadijumu nije sasvim razjašnjen. Profilisanje ekspresije gena tokom mijelopoeze omogućilo je uspostavljanje veze između ekspresije gena poznatih proteina granula i njihove lokalizacije unutar granula (Theilgaard-Monch i sar., 2005). Novije metode su omogućile predviđanje lokalizacije proteina za koje se ranije pretpostavljalo da nisu proteini granula neutrofilnih granulocita. Primeri za ovakve proteine, za koje se sada zna da su u sastavu granula neutrofilnih granulocita, su: haptoglobin (Theilgaard-Monch i sar., 2006), pentraksin-3 (Jaillon i sar., 2007), arginaza 1 (Jacobsen i sar., 2007) i fikolin 1 (Rørvig i sar., 2009).

Granule neutrofilnih granulocita (slika 2.19) su građene od spoljašnje fosfolipidne dvoslojne membrane i unutrašnjeg granularnog matriksa u kome se nalaze proteini spremni za egzocitozu ili za fuziju sa fagozomom. Kod najvećeg broja životinjskih vrsta, primarne granule su najveće i najgušće, gledajući gradijent gustine frakcionisanih sastojaka (Bertram, 1985). Veličina i oblik primarnih granula prema Borregaardu i sar. (1993) može biti veoma heterogena. Sekundarne granule su manje, manje gustine i brojnije nego primarne granule. Ove granule mogu biti ovalne, izdužene ili oblika štapića sa proširenim krajevima. Tercijarne granule su manje nego sekundarne granule.

Azurofilne granule sadrže kisele hidrolaze i antimikrobne proteine i duži niz godina su smatrane primarnim lizozomima. Kao i lizozomi, azurofilne granule sadrže u membrani granulofizin (CD63) (Cham i sar., 1993), međutim, za razliku od lizozoma one ne vrše ekspresiju lizozomalnih membranskih proteina LAMP-1 i LAMP-2 (Cieutat i sar., 1998). Sortiranje proteina u azurofilnim granulama nije povezano sa manozna-6-fosfatnim receptorom koji je esencijalan za lizozome (Dahms i sar., 1989; Michaelson i sar., 1992; Nauseef i sar., 1992). Prema Cieutat i sar. (1998), azurofilne granule se mogu smatrati sekretornim granulama koje nisu specijalizovane kao lizozomi. Osim CD63, u membrani azurofilnih granula su identifikovani i neki drugi proteini kao što su CD68 (Saito i sar., 1991), prezenilin 1 (Mirinics i sar., 2002), stomatin (Feuk-Lagerstedt i sar., 2002) i H⁺-ATP-aza (Nanda i sar., 1996).

Azurofilne granule ispoljavaju veliku heterogenost u veličini i obliku. Egesten i sar. (1994) su na osnovu fizičkih, citohemijskih i morfoloških karakteristika demonstrirali postojanje različitih populacija ovih granula. Na osnovu vremena nastajanja, azurofilne granule se mogu svrstati u dve kategorije: azurofilne granule siromašne u defenzinima koje se formiraju u periodu početka promijelocitnog stadijuma i azurofilne granule bogate u defenzinima koje se formiraju kasno u periodu tranzicije iz promijelocita u mijelocite (Arnljots i sar., 1998).

Nakon stimulacije, azurofilne granule podležu ograničenoj egzocitozi (Sengelov i sar., 1993; Faurschou i sar., 2002). Smatra se (Joiner i sar., 1989) da azurofilne granule doprinose ubijanju i degradaciji fagocitovanih mikroorganizama u fagolizozomima.



Slika 2.19. Granule (bele strelice) i vezikule (bele oznake) neutrofilnih granulocita - transmisiona elektronska mikroskopija (Weiss i Wardrop, 2010)

Mnogi proteini azurofilnih granula se sintetišu u obliku proformi proteina i nakon ulaska u granule podležu proteolitičkoj obradi isecanja aminoterminalnih propeptida da bi se dobila njihova aktivna konformacija (Lindmark i sar., 1999). Terminalni propeptidi sprečavaju greške u konformaciji, odnosno loše savijanje peptidnog lanca, autotoksičnost i blokadu biosinteze proteina u ćelijama (Garwicz i sar., 1998).

Mijeloperoksidaza (MPO) azurofilnih (peroksidaza pozitivnih) granula je mikro-bicidni hemoprotein molekulske mase 150 kDa koji se oslobađa u fagozom ili vanćelijski prostor nakon aktivacije neutrofilnih granulocita. MPO reaguje sa vodonik peroksidom

(H₂O₂) koji formira NADPH oksidaza i povećava toksični potencijal ovog oksidansa. U reakciji oksidacije hlorida, tirozina i nitrita, H₂O₂-MPO sistem indukuje stvaranje hipohlorne kiseline (HOCL) i drugih jedinjenja hlora, radikala tirozina i reaktivnih azotnih jedinjenja koji svi učestvuju u reakciji sa membranama patogenih mikroorganizama (Klebanoff, 1999).

Alfa defenzini su najzastupljeniji proteini azurofilnih graula i procenjuje se da čine oko 5% ukupnih proteina neutrofilnih granulocita. Defenzini su mali (oko 3,5 kDa), katjonski, antimikrobni i citotoksični peptidi (Ganz i sar., 1985) i sintetišu se u 75-aa proformi (Valore i Ganz, 1992). U promijelocitima se vrši obrada proformi defenzina koji se nakon toga slažu u azurofilne granule (Liu i Ganz, 1995). Nasuprot njima, defenzini koji se sintetišu u stadijumu mijelocita se ne nalaze u specifičnim granulama, nego se izlučuju u neobrađenoj, 75-aa proformi. Ovo dokazuje da obrada i unutarćelijska retencija zavisi od proteaza azurofilnih granula (Arnljots i sar., 1998). Alfa defenzini neutrofilnih granulocita ljudi ispoljavaju antimikrobnu aktivnost protiv velikog broja bakterija, gljivica, virusa i protozoa (Ganz i sar., 1985; Daher i sar., 1986; Lehrer i sar., 1988). Antimikrobna aktivnost defenzina se zasniva na formiranju multimernih transmembranskih pora (Wimley i sar., 1994). Takođe, Chertov i sar. (1996) i Yang i sar. (2000) ističu da defenzini indukuju hemotaksu monocita, CD4⁺ i CD8⁺ limfocita nakon egzocitoze.

Potentni antimikrobni protein azurofilnih granula je BPI (engl. *bactericidal permeability increasing protein*). To je visoko-reaktivni katjonski protein mase oko 50 kDa koji ima snažno toksično delovanje na gram negativne bakterije u nanomolarnim koncentracijama (Elsbach, 1998). Ovaj protein vezuje negativno naelektrisane rezidue lipopolisaharida (LPS) na spoljašnjoj membrani gram negativnih bakterija svojim N-terminalnim delom (Ooi i sar., 1987). Ovo vezivanje dovodi do pregrupisanja lipida membrane, inhibicije rasta i oštećenja membrane. C-terminalni deo BPI stimuliše vezivanje neutrofilnih granulocita i monocita za bakterije i fagocitozu (Iovine i sar., 1997).

Azurofilne granule sadrže tri strukturalno povezane serin proteaze sa mikrobicidnom aktivnošću serprocidina: proteinazu-3, katepsin G i elastazu. Serprocidini su katjonski polipeptidi mase od 25 do 29 kDa (Salvesen i sar., 1987; Sinha i sar., 1987; Campanelli i sar., 1990) koji ispoljavaju proteolitičku aktivnost prema velikom broju komponenti vanćelijskog matriksa kao što su elastin, fibronektin, laminin, kolagen tipa 4 i vitronektin. Ove serin proteaze indukuju aktivaciju ćelija epitela i endotela, makrofaga, limfocita i trombocita i

imaju antimikrobnu aktivnost (Owen i Campbell, 1999). Azurocidin je homolog serin proteaza koji se može naći u azurofilnim granulama neutrofilnih granulocita (Campanelli i sar., 1990b). On ima hemotaksičnu aktivnost prema monocitima, fibroblastima i T limfocitima (Chertov i sar., 1996) i povećava vaskularnu propustljivost tokom izlaska neutrofilnih granulocita iz krvnih sudova (Gautam i sar., 2001). Nasuprot serprocidinima, azurocidin je proteolitički neaktivan protein (Flodgaard i sar., 1991).

Podela peroksidaza negativnih granula na specifične (sekundarne) i želatinozne (tercijarne) predstavlja sa fiziološke strane veoma opravdanu podelu. Veće, specifične granule su bogate antimikrobnim supstancama dok to nije slučaj sa želatinoznim granulama. Sa druge strane, egzocitoza želatinoznih granula je daleko jednostavnija nego što je to slučaj sa specifičnim granulama (Sengelov i sar., 1995). Želatinozne granule su primarni rezervoar enzima za razgradnju matriksa i membranskih receptora potrebnih tokom izlaska neutrofilnih granulocita iz krvnih sudova, dok specifične granule imaju ulogu u antimikrobnim aktivnostima neutrofilnih granulocita tokom ubijanja patogena ili u fagozomu ili van ćelije (Jesaitis i sar., 1990; Mollinedo i sar., 1997). Najznačajniji antimikrobni peptidi peroksidaza negativnih granula su laktoferin, hCAP-18, NGAL, lizozim i Nramp-1. Ove granule sadrže tri fiziološki i patofiziološki značajne metaloproteaze: kolagenazu (matriks metaloproteazu 8, MMP-8), želatinazu (MMP-9) i leukolizin (MMP-25).

Laktoferin je glikoprotein mase 78 kDa koji se dominantno nalazi u specifičnim granulama neutrofilnih granulocita i ima antibakterijsku aktivnost protiv velikog broja gram pozitivnih i gram negativnih bakterija (Cramer i sar., 1985). Laktoferin pripada familiji transferina, proteina koji vezuju gvožđe i onemogućavaju njegovo korišćenje od strane bakterija čime se blokira bakterijski rast i razvoj (Oram i Reiter, 1968). Osim sposobnosti vezivanja gvožđa, laktoferin se vezuje za bakterijske membrane N-terminalnim regionom izazivajući ireverzibilno oštećenje bakterijske membrane i liziranje ćelije (Chapple i sar., 1998). Antibakterijska uloga laktoferina se pripisuje njegovom regionu koji se naziva laktofericin (Yamauchi i sar., 1993). Laktoferin se nalazi u većini telesnih tečnosti uključujući i mleko (Bullen i sar., 1972).

Sastojak granula neutrofilnih granulocita, hCAP-18, molekulske mase 19 kDa pripada antimikrobnim peptidima iz grupe katelicidina (Cowland i sar., 1995). N-terminalni region hCAP-18 ima homologiju sa ostalim katelicidinima dok C-terminalni deo (LL-37) ispoljava

antibakterijsku aktivnost protiv gram pozitivnih i gram negativnih bakterija (Turner i sar., 1998) i indukuje hemotaksu neutrofilnih granulocita, T limfocita i monocita (Yang i sar., 2000). Visoke koncentracije hCAP-18 postoje i u semenoj tečnosti (Malm i sar., 2000).

Protein želatinoznih granula (NGAL) je prvobitno identifikovan kao kovalentno vezan za želatinazu neutrofilnih granulocita (Kjeldsen i sar., 1993). Međutim, najveći deo NGAL se ne nalazi vezan za želatinazu, već kao monomer ili homodimer u specifičnim granulama (Kjeldsen i sar., 1994). Dokazano je da se NGAL vezuje za bakterijske siderofore sa gvoždem i na taj način ima bakteriostatsku aktivnost (Goetz i sar., 2002).

Lizozim je katjonski antimikrobni peptid molekulske mase od 14 kDa i nalazi se u svim granulama neutrofilnih granulocita, dok se najveća količina nalazi u specifičnim granulama (Lollike i sar., 1995). Utvrđeno je da lizozim raskida veze u molekulu peptidoglikana gram pozitivnih bakterija (Selsted i sar., 1978) i vezuje LPS gram negativnih bakterija (Tanida i sar., 1992) čime se sprečava pojava septičnog šoka (Takada i sar., 1994).

Kod makrofaga je prvo otkriven Nramp - 1 kao integralni membranski protein molekulske mase oko 100 kDa (Vidal i sar., 1993). On se kod neutrofilnih granulocita prvenstveno nalazi u želatinaznim granulama i nakon degranulacije se translocira do fagozomalne membrane (Canonne-Hergau i sar., 2002). Nramp 1 je transporter dvovalentnih katjona i smatra se da mu je uloga da uskrati iskorišćavanje dvovalentnih jona gvožđa, cinka i mangana od strane fagocitovanih bakterija.

Sve tri metaloproteaze (MMP) neutrofilnih granulocita se unutar ćelije nalaze u inaktivnim proformama i tek nakon egzocitoze podležu proteolitičkoj aktivaciji. Kolagenaza (MMP-8) se nalazi u specifičnim granulama (Murphy i sar., 1977), želatinaza (MMP-9) se prvenstveno nalazi u želatinoznim granulama dok je leukolizin prisutan i u specifičnim (oko 10%) i želatinoznim (oko 40%) granulama, ali i u sekretornim vezikulama (oko 30%) i plazma membrani (oko 20%) neutrofilnih granulocita. Sve metaloproteaze neutrofilnih granulocita razgrađuju vanćelijski matriks sastavljen od kolagena, fibronektina, proteoglikana, laminina i želatina i imaju ulogu u prolasku neutrofilnih granulocita kroz međućelijski prostor endotela prilikom migracije iz krvnih sudova u tkiva (Kang i sar., 2001).

Sekretorne vezikule neutrofilnih granulocita su glavni rezervoar membranskih receptora potrebnih za ranu fazu neutrofilnog imunskog odgovora. One se mobilišu kao

odgovor na različite inflamatorne stimulse (Sengelov i sar., 1993; Sengelov i sar., 1995). Membrana sekretornih vezikula je bogata CD11b/CD18 receptorima za β_2 integrine (Sengelov i sar., 1993), CR1 receptorima za komplement (Sengelov i sar., 1994a), receptorima za formilovane bakterijske peptide (formilovani metionil-leucinfenilalanin, fMLP) (Sengelov i sar., 1994b), CD14 receptorima za LPS/lipotehičnu kiselinu (Detmers i sar., 1995), CD16 receptorima za Fc γ III i leukolizinom (Kang i sar., 2001).

Oslobađanje sadržaja granula zavisi od stimulacije receptora neutrofilnih granulocita od strane različitih molekula. Jedan od najčešćih aktivatora degranulacije je formilovani metionil-leucin-fenilalanin (fMLP). Za razliku od neutrofilnih granulocita primata, zečeva, morske prasadi i miševa čije neutrofilne granulocite aktivira fMLP, neutrofilni granulociti goveda, svinja, mačaka i pasa se ne aktiviraju na ovaj način usled nedostatka receptora za ovaj peptid (Styrt, 1989). Sadržaj granula se nakon aktivacije oslobađa unutar fagozoma (primarne granule) ili u vanćelijsku okolinu (sekundarne i tercijarne granule) (Mollinedo i sar., 2006). Tokom egzocitoze, granule se inkorporiraju u fagozom dok se sekretorne vezikule inkorporiraju u membranu neutrofilnih granulocita. Ovaj proces inkorporiranja granula i vezikula je krucijalan jer se na taj način u membranu inkorporiraju i receptori potrebni za hemotaksu, ekstravazaciju, migraciju i imunomodulaciju neutrofilnih granulocita.

Nakon aktivacije neutrofilnih granulocita, prvo se oslobađa sadržaj sekretornih vezikula tokom interakcije neutrofilnih granulocita sa endotelom krvnih sudova. U isto vreme se sa površine neutrofilnih granulocita oslobađa L-selektin (Faurischou i Borregaard, 2003). Receptori oslobođeni iz vezikula omogućavaju čvrst kontakt neutrofilnih granulocita i endotela krvnih sudova (Borregaard i sar., 1993). Sledeće se otpuštaju tercijarne granule i njihov sadržaj razlaže matriks među ćelijama kroz koje prolaze neutrofilni granulociti (Faurischou i Borregaard, 2003). Sekundarne granule se oslobađaju kao treće i njihova uloga je, zajedno sa primarnim granulama, u antimikrobnom delovanju. Primarne granule zahtevaju naj snažniji stimulus za degranulaciju.

2.2.3.4.3. Migracija neutrofilnih granulocita iz krvnih sudova u tkiva

Neutrofilni granulociti cirkulišu u krvi samo nekoliko sati, nakon čega, kod zdravih životinja napuštaju cirkulaciju i odlaze u tkiva, pre svega u gastrointestinalni trakt, pluća i kožu (Weiss i Wardrop, 2010). Ovaj proces je esencijalan za sprečavanje bakterijskih infekcija. Kada broj neutrofilnih granulocita dostigne kritično nizak nivo ispod 500

segmentiranih neutrofilnih granulocita po μL krvi, to dovodi do povećane prijemčivosti životinja na bakterijske infekcije. Neutrofilni granulociti odlaze iz krvi do mesta infekcije gde dolaze u kontakt sa mikroorganizmima koje fagocituju i pokušavaju da ubiju.

Regrutovanje neutrofilnih granulocita (i ostalih leukocita) na mesto infekcije je kaskadna reakcija koja uključuje jasne korake sve do izlaska iz krvnih sudova i ulaska u tkiva. Ona uključuje „hvatanje” neutrofilnih granulocita za površinu endotela, njihovo kotrljanje, adheziju i transmigraciju između ili kroz ćelije endotela. Izlazak neutrofilnih granulocita iz krvnih sudova započinje promenama na površini endotela nakon stimulacije inflamatornim medijatorima (histamin, leukotrijeni i citokini) koji se oslobađaju iz tkivnih leukocita nakon njihovog kontakta sa patogenima (Phillipson i Kubes, 2011). Endotelne ćelije krvnih sudova se mogu direktno aktivirati aktivacijom svojih „*pattern-recognition*” receptora (PRR) patogena, nakon čega se, u vremenu od nekoliko minuta povećava ekspresija adhezionih molekula, konkretno P-selektina iz Wibel-Palade telašaca (Kolaczowska i Kubes, 2013). Za razliku od P-selektina koji se mobilisu, molekuli E-selektina se u endotelnim ćelijama sintetišu *de novo* i do njihove ekspresije dolazi u roku od 90 minuta (Petri i sar., 2008). Funkcije oba selektina, i selektina P i selektina E se preklapaju čime se potencira vezivanje neutrofilnih granulocita za površinu endotelne ćelije (Ley i sar., 2007). Nakon ekspresije P i E selektina, na površini endotela, oni vezuju njihove ligande, kao što je P-selektin glikoprotein ligand 1 (PSGL1) (Zarbock i sar., 2011). To dovodi do „hvatanja” cirkulišućih neutrofilnih granulocita za površinu endotela i njihovog kotrljanja po površini endotela u smeru kretanja krvi (Sadik i sar., 2011). Primarnu ulogu u zadržavanju limfocita u limfnim čvorovima imaju L-selektini (Arbones i sar., 1994). Međutim, utvrđeno je (Stein i sar., 1999) da L-selektini, koji se nalaze na mikrovilima leukocita imaju značajnu ulogu u neutrofilno-endotelnoj reakciji. Novija istraživanja sugerišu da ekspresija L-selektina na cirkulišućim neutrofilnim granulocitima pomaže „hvatanju” tih neutrofilnih granulocita za neutrofilne granulocite koji su već vezani za površinu endotela, čime se usporava brzina većeg broja ovih ćelija i olakšava njihova migracija (Petri i sar., 2008). Ovakav proces se naziva sekundarno „hvatanje” neutrofilnih granulocita. Osim ovoga, utvrđeno je da kotrljajući neutrofilni granulociti ostavljaju male fragmente PSGL1 na površini endotela za koje se hvataju molekuli L-selektina (Sperandio i sar., 2003). Neutrofilni granulociti se kotrljaju po ćelijama endotela pod velikim pritiskom na svojoj površini (Sundd i sar., 2011).

Kotrljanje neutrofilnih granulocita u ovakvim uslovima zahteva brzo uspostavljanje i prekidanje adhezionih veza sa ćelijama endotela (Ramachandran i sar., 2004).

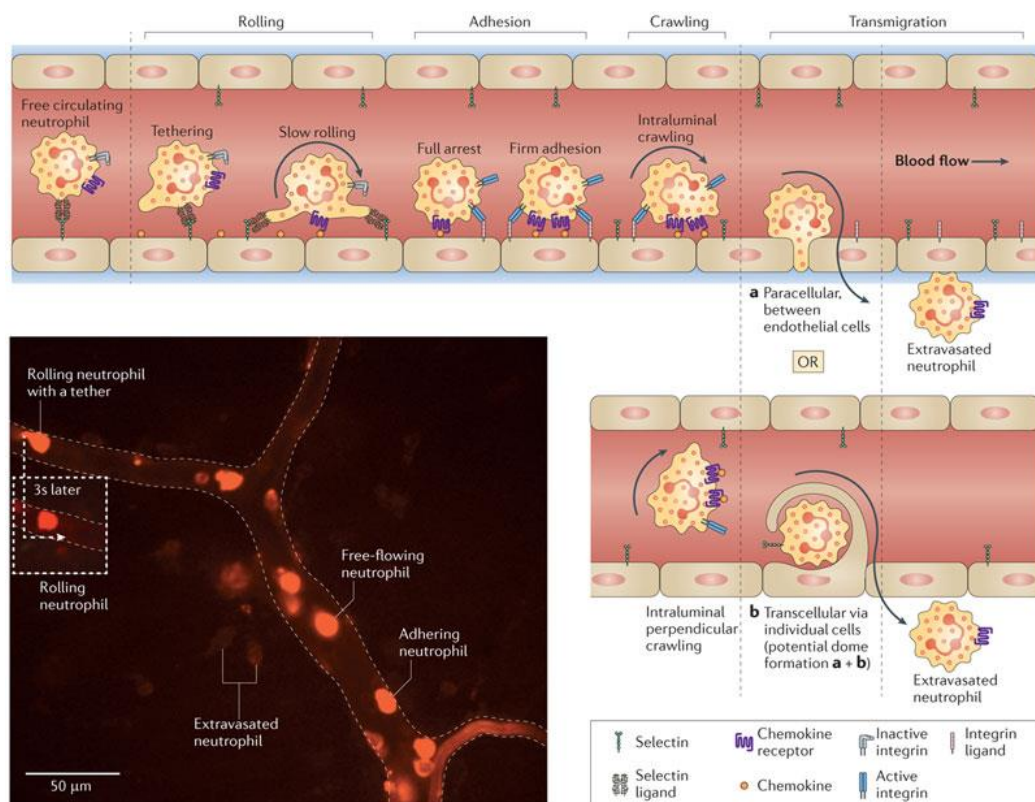
Kotrljanje neutrofilnih granulocita olakšava kontakt sa hemokinima na površini endotela i njihovu posledičnu aktivaciju. Puna aktivacija neutrofilnih granulocita je dvostepeni proces u kome se prvo neutrofilni granulociti aktiviraju pod uticajem proinflamatornih citokina kao što su tumor nekrotični faktor alfa (TNF- α), interleukin 1 β ili kontaktom sa aktiviranim endotelnim ćelijama, nakon čega sledi drugi stepen njihove aktivacije pod uticajem PAMPs, hemoatraktanata ili faktora rasta (Summers i sar., 2010). Iniciranje je prema ovim autorima neophodno da bi se postigao najveći nivo degranulacije neutrofilnih granulocita i aktivacije NADPH oksidaza sistema. U aktivaciji neutrofilnih granulocita ključnu ulogu imaju ELR-CXC hemokini (Sanz i Kubes, 2012). ELR-CXC hemokini, koji uključuju CXCL8 (IL-8), CXCL1, CXCL2 i CXCL5 vezivanjem za CXCR2 aktiviraju neutrofilne granulocite i stimulišu njihovu adheziju za endotel krvnih sudova (Pruenster i sar., 2009; Williams i sar., 2011). Hemokini, koji su pozitivno naelektrisani molekuli, se vezuju i imobilisu na površini endotela vezivanjem za negativno naelektrisane molekule heparin sulfata (Massena i sar., 2010). Na ovaj način se formira intravaskularni hemotaksični gradijent. Nakon prestanka infekcije, hemokini nestaju u procesu endocitoze od strane endotelne ćelije čime se smanjuje izlazak neutrofilnih granulocita iz krvnih sudova (Hillyer i Male, 2005).

Aktivacija hemokinskih receptora na neutrofilnim granulocitima indukuje promene u konformaciji integrina membrane što dovodi do povećanja afiniteta integrina za njihove ligande kao što su ćelijski adhezioni molekuli (engl. *cell adhesion molecules* - CAM). Neutrofilni granulociti vrše ekspresiju integrina LFA1 (α 1 β 2; CD11a-CD18) i MAC1 (α M β 2; CD11b-CD18), čija se konformacija menja nakon stimulacije hemokinskih receptora. Posle toga, ovi integrini vezuju ćelijske endotelne molekule kao što su ICAM1 i ICAM2. Vezivanje LFA1 za ICAM1 je neophodno za čvrstu adheziju neutrofilnih granulocita za endotel krvnih sudova (Phillipson i sar., 2005). Konformacione promene integrina su striktno regulisane i mogu biti postepene ili trenutne. Hemokini takođe, prema Jones i sar. (1988), indukuju relokalizaciju unutarćelijskih depoa MAC1 na površinu ćelije.

Nakon aktivacije integrina, citoskeletni protein talin 1 vezuje β subjedinicu citoplazmatskog dela molekula integrina i indukuje izduživanje LFA1 nakon čega se menja

konformacija ovog integrina dovodeći do intermedijarnog afiniteta LFA1 i posledičnog kotrljanja neutrofilnih granulocita po površini endotela. Nasuprot tome, obostrana aktivacija talin 1 i kindlin 3 citoskeletnih proteina indukuje takvu konformaciju LFA1 koja ima za posledicu čvrsto vezivanje neutrofilnih granulocita za endotel i „zaključavanje” njihovih pozicija (Lefort i sar., 2012). Prema Cichetti i sar. (2002), vezivanje integrina neutrofilnih granulocita za njihove ligande na površini endotela aktivira signalne puteve unutar neutrofilnih granulocita koji stabilizuju njihovu adheziju i iniciraju pokretljivost ćelija.

Model izlaska neutrofilnih granulocita u većini slučajeva zahteva prisutvo selektina i/ili integrina (Megens i sar., 2011) (slika 2.20). Međutim, postoje određene razlike među određenim tkivima i krvnim sudovima u načinu na koji leukociti izlaze iz krvnih sudova. Tako, izlazak neutrofilnih granulocita iz portalnih i centralnih venula jetre, uključuje njihovo kotrljanje po površini endotela i nakon toga čvrstu adheziju.



Nature Reviews | Immunology

Slika 2.20. Model izlaska neutrofilnih granulocita iz krvnih sudova (Weiss i Wardrop, 2010).

Za razliku od toga, neutrofilni granulociti u sinusoidnim kapilarima ne ulaze u fazu kotrljanja već prave direktno čvrstu adheziju vezu sa endotelom kapilara (Wong i sar., 1997). Adherencija neutrofilnih granulocita za sinusoidne kapilare, u uslovima sterilne inflamacije, zahteva MAC1-ICAM1 interakciju, ali tokom infekcije dolazi do integrin-nezavisne interakcije hijalurona na endotelnim ćelijama sa CD44 molekulom neutrofilnih granulocita (McDonald i sar., 2008). Isti autori naglašavaju da se u inficiranoj jetri oslobađa interleukin 10 (IL-10) koji smanjuje ekspresiju MAC1 čime se omogućuje CD44 zavisna adhezija.

Mobilizacija neutrofilnih granulocita u mozgu, osim od integrina i selektina, zavisi i od prisustva trombocita koji se nalaze pilepljeni uz endotel i služe kao most između ćelija endotela i neutrofilnih granulocita (Carvalho-Tavares i sar., 2000). Ovi trombociti ekspimiraju P-selektin u većoj meri endotelne ćelije (Ostrovsky i sar., 1998), što omogućava veći kapacitet mobilizacije neutrofilnih granulocita. Takođe, ovi trombociti su i značajan izvor hemokina za neutrofilne granulocite (Drechsler i sar., 2010).

Adhezija neutrofilnih granulocita je pripremni korak pre njihove transmigracije u tkiva. Transmigracija neutrofilnih granulocita se ne mora odigrati na mestu njihovog zaustavljanja na površini endotela. Neki neutrofilni granulociti kao da skeniraju površinu endotela kroz koju će proći izduživanjem pseudopoda i „opipavanjem” endotelnih ćelija, dok su u isto vreme čvrsto adherirani za mikrovaskulatornu površinu (Jenne i sar., 2012). Ovakav način kretanja neutrofilnih granulocita se često naziva neutrofilno puzanje. Transmigracija neutrofilnih granulocita se najčešće dešava na granici između dve endotelijalne ćelije prema kojoj oni aktivno puze. Kretanje neutrofilnih granulocita prema mestu njihovog izlaska zavisi od interakcije ICAM 1 na endotelnim ćelijama i MAC1 na membrani neutrofilnih granulocita.

Da bi napustili cirkulaciju, neutrofilni granulociti moraju proći kroz endotel krvnih sudova, za šta im je potrebno od 2 do 5 minuta, kao i bazalnu membranu za šta im je potrebno između 5 i 15 minuta (Kolaczowska i Kubes, 2013). Za proces transmigracije neutrofilnih granulocita, neophodno je prisustvo integrina i ćelijskih adhezivnih molekula kao što su ICAM 1, ICAM 2 i vaskularni ćelijski adhezivni molekul 1 (VCAM1) ali i različitih graničnih proteina kao što su trombocitno-endotelijalni adhezioni molekul 1 (PECAM1, CD31), CD99, granični adhezioni molekuli (JAM), epitelijalni ćelijski adhezioni molekuli

(ECAM) kao i neki drugi endotelijalni molekuli ne sasvim poznate funkcije kao što su poliovirus receptor (PVR, CD155), ektoenzimi (npr. VAP1 i CD157) i leukocitni specifični protein (LSP1) (Reymond i sar., 2004; Ley i sar., 2007; Petri i sar., 2011; Phillipson i Kubes, 2011). Prolazak neutrofilnih granulocita kroz endotelni sloj se dešava ili paracelularno (između endotelijalnih ćelija) ili transcelularno (kroz endotelijalne ćelije). Paracelularni prolazak zahteva kidanje međućelijskih proteinskih veza među ćelijama kao što su one koje formira vaskularni endotelijalni kadherin (VE-kadherin). Neutrofilni granulociti najčešće prolaze paracelularno (Phillipson i sar., 2006; Petri i sar., 2008; Woodfin i sar., 2011) što je brže i efikasnije, za razliku od transcelularnog puta koji zahteva čak 20-30 minuta (Phillipson i sar., 2008).

Tokom transcelularnog procesa migracije, endotelijalne ćelije formiraju transmigratorne membranske projekcije slične mikrovilima, koje formiraju omotač u oblik nepotpune kupole oko neutrofilnih granulocita (slika 2.20). Ove projekcije membrane ćelija endotela su bogate sa ICAM1 i VCAM1 i formiranje kupola zavisi od od interakcije sa LFA1 i VLA4 (engl. *very late antigen 4*, integrin $\alpha 4$) (Barreiro i sar., 2002; Carman i Springer, 2004). Formiranje kupole takođe zavisi od ekspresije leukocitnog specifičnog proteina 1 (LSP1) koji vezuje F-aktin jedra endotelijalnih ćelija (Petri i sar., 2008). Ovaj proces ne treba povezivati sa fagocitozom zbog toga što neutrofilni granulociti nikada ne ulaze unutar endotelinih ćelija, već samo bivaju pokriveni njihovim membranskim projekcijama (Phillipson i sar., 2008). Isti autori navode da ćelije endotela nikada ne prave formaciju kompletne kupole oko neutrofilnih granulocita.

Tokom transmigracije dolazi do promena u formaciji citoskeleta endotelinih ćelija i njihove veze sa ekstracelularnim matriksom (ECM). U tom procesu dolazi do selektivnog uklanjanja proteina paksilina i fokalne adhezije kinaze (FAK) sa adhezionih proteina kako se približava transmigracija neutrofilnih granulocita i time se olakšava proces njihovog prolaska (Parsons i sar., 2012). Endotelna bazalna membrana je struktura koja je kompletno građena od ECM proteina uključujući kolagene i laminine. Neutrofilni granulociti sadrže specifične proteaze, kao što su MMP (MM9) ili serin proteaze (elastaza) koje ispoljavaju enzimsku aktivnost prema ECM molekulima. Moglo bi se zaključiti da proteaze neutrofilnih granulocita seku ECM, ali je utvrđeno da one samo potpomažu izlazak neutrofilnih granulocita kroz manje porozne delove ECM (Wang i sar., 2006).

Ranije se smatralo da tokom procesa inflamacije neutrofilni granulociti umiru u tkivima u kojima su mobilisani nakon čega bivaju fagocitovani od strane makrofaga. Međutim, rezultati *in vivo* istraživanja ukazuju da neutrofilni granulociti mogu ulaziti u proces reverzne migracije, odnosno ponovnog vraćanja u cirkulaciju (Mathias i sar., 2006; Elks i sar., 2011). Osim toga, Buckley i sar. (2006) su utvrdili da su neutrofilni granulociti, koji su prethodno migrirali u tkiva, a zatim se vratili u cirkulaciju u procesu reverzne migracije, otporniji prema procesu apoptoze nego ostali neutrofilni granulociti i da predstavljaju dugoživeće ćelije.

2.2.3.4.4. Fagocitoza

Neutrofilni granulociti, zajedno sa makrofagima sačinjavaju profesionalne fagocitne ćelije koje imaju specifičnu sposobnost da "gutaju" i na taj način eliminišu patogene mikroorganizme, mrtve i oštećene ćelije (Lee i sar., 2003). Fagocitne ćelije prepoznaju ciljeve fagocitoze pomoću specijalnih receptora na svojim membranama, što predstavlja okidač za kompleksan mehanizam mobilizacije svih unutarćelijskih molekula koji učestvuju u ubijanju i razlaganju patogena.

Najveći deo saznanja o molekularnom mehanizmu fagocitoze je dobijen izučavanjem fagocitoze od strane makrofaga koji su, za razliku od neutrofilnih granulocita, otporni na uticaj genetskih manipulacija (Lee i sar., 2003). Fagocitoza je membranski proces pod kontrolom aktinskog citoskeleta koji rezultira unošenjem stranih materija veličine 0,5-5 μm . Inicijalni događaj u procesu fagocitoze je prepoznavanje mikroorganizama od strane neutrofilnih granulocita pomoću specifičnih receptora na membrani.

Da bi neutrofilni granulociti bili u stanju da generišu fagozom, oni moraju da koordiniraju kompleksan proces polimerizacije aktina i remodeliranja plazma mebrane u cilju obuhvatanja patogenog mikroorganizma. Generisanje fagozoma zavisi od tipa cilja fagocitoze, od toga da li je taj cilj obeležen opsoninima ili ne, veličine, oblika i prisustva receptora na površini fagocita. Neutrofilni granulociti na svojoj membrani nose nekoliko familija receptora od kojih je svaka familija medijator fagocitoze određene vrste mikroorganizma (Nordenfelt, 2010) (tabela 2.1).

Tabela 2.1. Receptori neutrofilnih granulocita koji učestvuju u fagocitozi (Nordenfelt, 2010)

Receptor	Glavni ligand
Fc γ RI (CD64)	IgG1, IgG3
Fc γ RIIA (CD32)	IgG1, IgG3
Fc γ RIIB	IgG1, IgG3
Fc γ RIIIB (CD16)	IgG1, IgG3
Fc γ RIV	IgG2
Fc α RI	IgA1, IgA2
CR1	C3b, C3bi, C4b, C4bi
CR3	C3bi
CR4	C3bi
CR5	C5a
Dectin-1	β -glycan
Toll-like receptori	Različiti PAMP
f-Met-Leu-Phe	Bakterijski peptidi

Ovi receptori se mogu podeliti u dve glavne grupe, od kojih prva grupa prepoznaje molekule koji su zajednički većem broju mikroorganizama, kao što su neke bakterijske komponente i ovi receptori pripadaju grupi „*pattern-recognition*” receptora (PRR). U ove receptore spadaju TLR (Hayashi i sar., 2003), Nod-like receptori (Ekman i sar., 2010) i dektin-1 (Kennedy i sar., 2007). Pomenuti autori su u svojim radovima opisali ulogu ovih receptora u stimulaciji funkcija neutrofilnih granulocita.

Druga grupa neutrofilnih receptora u medijaciji fagocitoze su opsoninski receptori koji prepoznaju molekule (opsonine) domaćina koji su obeležili ćeliju koja treba da bude fagocitovana. U ove receptore spadaju receptori za komponente komplementa i Fc receptori za imunoglobuline. Neutrofilni granulociti vrše konstantnu ekspresiju Fc γ RIIA (CD32), Fc γ RIIIB (CD16) i Fc γ RIV (Repp i sar., 1991; Nimmerjahn i sar., 2006), receptora za imunoglobuline G klase (IgG) dok je ekspresija Fc γ RI (CD64) inducibilne prirode i do ekspresije ovog receptora dolazi pod uticajem G-CSF (Witko-Sarsat i sar., 2000). Međutim, tokom sistemske infekcije i sepse, neutrofilni granulociti vrše ekspresiju Fc γ RI (CD64). Fjaertoft i sar. (2007) i Venet i sar. (2011) su utvrdili da, zajedno sa još nekim površinskim markerima, ekspresija CD64 neutrofilnih granulocita predstavlja specifičan marker bakterijske infekcije i označava aktivaciju neutrofilnih granulocita. Neutrofilni granulociti, kao i najveći broj ostalih ćelija sa fagocitnom sposobnošću, ekspimiraju specifične receptore Fc α R (CD89) za imunoglobuline A klase (IgA). U prisustvu specifičnih IgA, Fc α R inicira neutrofilni odgovor sličan onome koji iniciraju IgG preko Fc γ RII. Dimerni IgA povezani J

lancem, ali i monomeri IgA koji se nalaze u serumu, su dobri opsonini za bakterije i promovišu oksidativni prasak i fagocitozu neutrofilnih granulocita podjednako dobro kao IgG (Vidarsson i sar., 2001). Za razliku od IgG, imunoglobulini A klase ne aktiviraju sistem komplementa.

Generisanje target-specifičnih IgG je ključno za opsonizaciju patogena i njihovu fagocitozu od strane neutrofilnih granulocita. U slučaju bakterije *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) specifična antitela G klase su usmerena protiv površinskih molekula ove bakterije. Čelijski zid Gram pozitivnih bakterija, uključujući i *S. aureus* sadrži debeo sloj peptidoglikana u koji su uronjeni, kovalentno vezani proteini koji iniciraju stvaranje IgG i depoziciju komplementa. Površinski proteini su često i faktori virulencije i dokazano je da imaju uticaj u patogenezi infekcije (Foster i sar., 2014). Klamping faktor A (Clf A) i protein A koji cirkulišu u serumu mogu imati ulogu antitela i vezivati površinske proteine bakterija.

Receptori koji prepoznaju faktore komplementa vezane za površinu patogena su CR 1 (engl. *complement receptor 1*, CD35), CR2 (CD21), CR3 (CD11b/CD18; MAC-1), CR4 (CD11c/CD18, integrin $\alpha X\beta 2$), i CR koji pripada Ig superfamiji, CR1g (Holers, 2014). Svi ovi receptori prepoznaju i vezuju C3b i/ili iC3b komponente komplementa. Neutrofilni granulociti vrše ekspresiju CR1 i CR3 dok makrofagi vrše ekspresiju CR3 i CR4. CR1 je membranski glikoprotein koji specifično vezuje C3b, C4b, a sa nižim afinitetom i iC3b komponentu komplementa. Ovaj receptor je strukturno sličan regulatorima aktivacije komplementa (Ahearn i Fearon, 1989; Krych-Goldberg i Atkinson, 2001). Kao i CR4 i CR3 je heterodimerni glikoprotein koji specifično vezuje iC3b fragment (Wright i sar., 1989; Ehlers, 2000). CR1g je receptor koji veoma efikasno učestvuje u fagocitozi komplementom opsonizovanih čestica i inicijalnom formiranju fagozoma (Helmy i sar., 2006).

Na površini fagocitnih ćelija se nalaze tri tipa proteinskih receptora sa afinitetom za C1q faktor komplementa koji se deponuje nakon vezivanja IgM za površinu ćelije. Receptor cC1qR koji je sličan kalretikulinu, vezuje kolagenu sličan kraj C1q, C1qRp je fagocitoza-promovišući receptor, dok gC1qR receptor vezuje globularni kraj C1q komponente komplementa. Receptori za C1q imaju ulogu okidača i regulatora aktivacije komplementa i neutrofilni granulociti vrše ekspresiju sva tri navedena receptora (Eggleton i sar., 2000; Holers, 2014).

Važnu grupu receptora za komplement (CR) na membrani neutrofilnih granulocita sačinjavaju receptori za rastvorljive anafilotoksine C3a i C5a. Receptori za C3a (C3aR) i C5a (C5aR) pripadaju famili G protein-vezujućih receptora (GPCR). Neutrofilni granulociti vrše ekspresiju velikog broja ovih receptora koji učestvuju u neutrofilnom imunskom odgovoru. Ovi receptori vezuju bakterijske peptide i toksine (formil-peptid receptori, FPR1 i FPR2), lipidne medijatore kao što su leukotrijen B₄, faktor aktivacije trombocita i hemokinske receptore (Lattin i sar., 2007; Sun i Ye, 2012). Iako učestvuju u migraciji neutrofilnih granulocita, najveći broj ovih liganda, kao što su C3a i C5a direktno aktivira neutrofilne granulocite na proizvodnju reaktivnih oksidativnih vrsta (ROS). Mollnes i sar. (2002) su demonstrirali ključnu ulogu C5a–C5aR interakcije u procesu fagocitoze bakterije *Escherichia coli* (*E. coli*) od strane neutrofilnih granulocita. Slično ovome, komponente komplementa aktiviraju fagocitozu *S. aureus* (Skjeflo i sar., 2014).

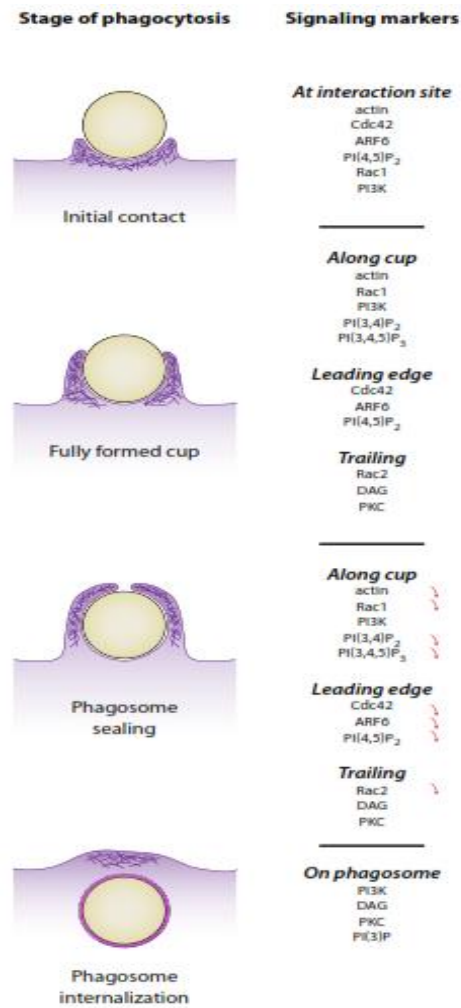
Inicijacija neutrofilnih granulocita (engl. *neutrophil priming*) je događaj u kome imunski odgovor ćelije na aktivacioni stimulus biva pojačan prethodnim dejstvom inicirajućeg agensa. Inicijacija neutrofilnih granulocita je proces koji dovodi do dramatičnog povećanja aktivnosti neutrofilnih granulocita i omogućava brži i efikasniji odgovor, uključujući fagocitozu patogena (El-Benna i sar., 2008; Kolaczowska i sar., 2013). Inicirajući agensi deluju direktno na ekspresiju površinskih receptora, ali i na unutarćelijsko generisanje superoksidnih anjona, degranulaciju i sekreciju medijatora (Wofford i Wright, 2007). Inicirani neutrofilni granulociti nemaju povećanu oksidaznu aktivnost, međutim naknadna stimulacija ovih neutrofilnih granulocita dovodi do jačeg oksidativnog odgovora nego što je to slučaj kod neiniciranih ćelija. Inicijaciju neutrofilnih granulocita vrši određeni broj molekula kao što su aktivatori komplementa C3a i C5a (Skjeflo i sar., 2014), interferon gama (IFN- γ) (Edwards i sar., 1988; Ellis i Beaman, 2004), interleukin 8 (IL-8) (Mitchell i sar., 2003), tumor nekrotični faktor alfa (TNF- α) (Rainard i sar., 2000) i granulocitno/makrofagni stimulišući faktor (G-CSF i GM-CSF) (Khwaja i sar., 1992). Osim toga, stimulacija neutrofilnih receptora za G-CSF, GM-CSF i IFN- γ odlaže apoptozu i na taj način produžava život neutrofilnih granulocita (Futosi i sar., 2013).

Neutrofilni granulociti vrše ekspresiju i najvećeg broja „*toll-like*” receptora (TLR) koji takođe vrše inicijaciju ovih ćelija. Vezivanje patogenih mikroorganizama za TLR stimuliše fagocitozu (Hayashi i sar., 2003) i oksidativni prasak (Jann i sar., 2011). *Toll-like*

receptori nisu fagocitni receptori *per se*, ali učestvuju u povezivanju fagocitoze i inflamatornog odgovora stimulacijom produkcije citokina.

Proces fagocitoze se odvija u nekoliko faza: 1. vezivanje opsonizovanih čestica nakon njihovog prepoznavanja od strane specifičnih receptora 2. ekstenzija pseudopodija oko opsonizovane čestice dok se još nalazi van neutrofilnih granulocita (tzv. "*zippering*") i 3. kompletno okruživanje fagocitovane ćelije od strane membrane neutrofilnih granulocita uz formiranje fagozoma (slika 2.21).

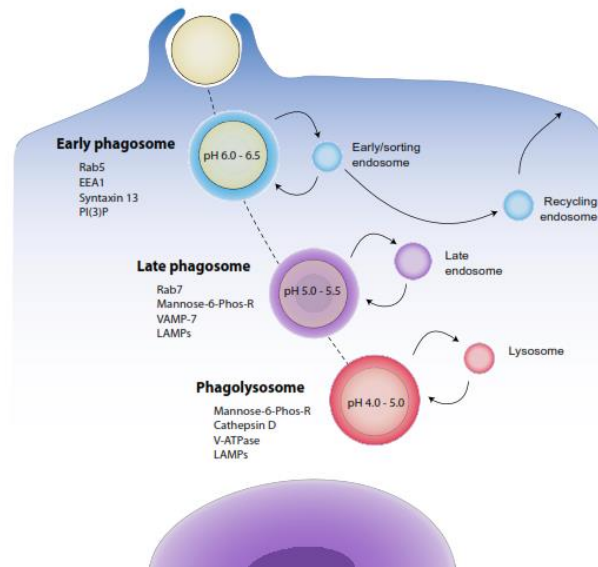
Fagocitoza počinje vezivanjem IgG-opsonizovanih target ćelija preko FcγR neutrofilnih granulocita i fosforilacijom njihovih citoplazmatskih tirozinskih aktivacionih motiva (ITAMS) preko aktivacije Src-tirozin kinaza. Src kinaza deficijentni miševi u eksperimentima pokazuju reakciju odložene fagocitoze (Crowley i sar., 1997). Fosforilisani ITAMS služe kao mesto vezivanja SH2 domena Syk tirozin kinaze koja je okidač aktivacije PI3-kinaze i Rho proteina. Aktivacija Rho proteina rezultira polimerizacijom aktina koji zajedno sa aktivacijom PI3-senzitivnog miozina X (Cox i sar., 2002) dovodi do formiranja membranskih protruzija koje se pružaju oko opsonizovane čestice i formiranja fagocitne kupole koja okružuje fagocitovanu ćeliju (Swanson i Baer, 1995; Greenberg i sar., 1995; Massol i sar., 1998). Syk deficijentni miševi, ili miševi kojima je aplikovan inhibitor PI3-kinaze, formiraju fagocitne kupole bogate aktinom koje nisu u stanju da potpuno okruže opsonizovanu česticu i na taj način je onemogućeno stvaranje fagozoma (Kiefer i sar., 1998).



Slika 2.21. Fagocitoza i formiranje fagozoma (Nordenfelt, 2010)

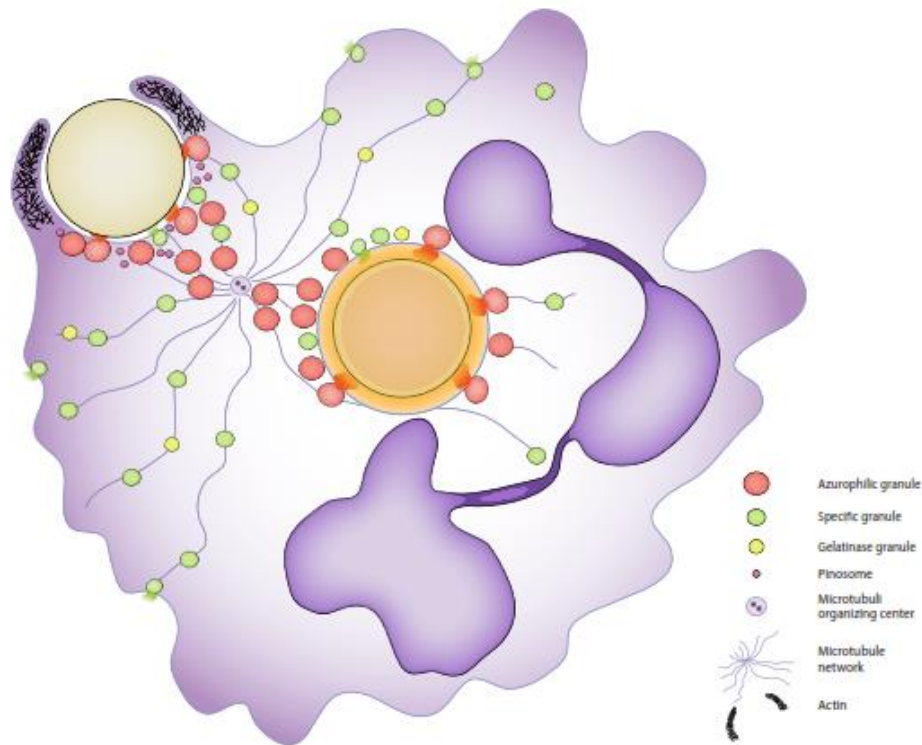
Proces fagocitoze ćelija koje su opsonizovane C3bi komponentom komplementa i vezane za komplement receptor 3 (CR3) je drugačiji nego kada su ćelije opsonizovane antitelima. Komplementom opsonizovane target ćelije praktično "tonu" unutar ćelije pri čemu se stvaraju samo male protruzije tokom ulaska target ćelija. Za razliku od fagocitoze stimulisane FcγR receptorima, ingestija C3bi opsonizovanih materija ne zavisi od koncentracije slobodnog citozolnog kalcijuma (Ca) (Faellman i sar., 1989). Takođe, fagocitozu stimulisanu FcγR receptorima prati aktivacija oksidativnog praska, produkcija metabolita arahidonske kiseline i citokina dok to nije slučaj sa fagocitozom posredovanom CR3 receptorima (Wright i Silverstein, 1983; Yamamoto i Johnston, 1984). Iako i makrofagi i neutrofilni granulociti imaju sličan mehanizam fagocitovanja ciljnih ćelija, ipak postoje razlike u načinu fagocitoze i konačnom ishodu tog procesa. Kod makrofaga, nakon formiranja fagozomalne vakuole (fagozoma) počinje proces sazrevanja fagozoma koji je

rekapitulacija endocitoze (Vieira i sar., 2002). Novoformirani fagozom se sekvencijalno fuzionira sa ranim endozomom (pH 6.5–6.0), kasnim endozomom (pH 5.5–6.0) i kada zreli fagozom postane kiseo (pH <5,5), dolazi do spajanja sa lizozomom (pH ≤5.0) nakon čega se formira fagolizozom (slika 22) u čijem sastavu se nalaze hidrolitički enzimi kao i specifični antimikrobni peptidi koji ubijaju i degradiraju patogene mikroorganizme (Hackam i sar., 1997).



Slika 2.22. Sazrevanje fagozoma i formiranje fagolizozoma kod makrofaga (Nordenfelt, 2010)

Za razliku od makrofaga koji vrše aktivnu endocitozu, zreli neutrofilni granulociti su relativno pasivni. Konvencionalni rani i zreli endozom i lizozomi se retko nalaze kod neutrofilnih granulocita. Umesto toga, sledeći korak fagocitoze neutrofilnih granulocita je mobilizacija i fuzija fagozoma sa različitim neutrofilnim granulama što rezultira oslobađanjem sadržaja granula koji je potreban za ubijanje mikroorganizama (slika 2.23) (Nordenfelt i Tapper, 2011; Flannagan i sar., 2012).



Slika 2.23. Fuzionisanje fagozoma sa granulama neutrofilnih granulocita (Nordenfelt i Tapper, 2011)

Neutrofilni granulociti su u stanju da fagocituju i do 50 bakterija uz održavanje konstantne veličine i oblika. Vreme za koje neutrofilni granulociti mogu fagocitovati čestice koje su opsonizovane imunoglobulinima G klase može da iznosi i manje od 20 sekundi (Segal i sar., 1988) pa sve do između 1 i 3 minuta (Tapper i Grinstein, 1997).

Fuzija azurofilnih i specifičnih granula sa plazma membranom se obično dešava pre formiranja fagozoma i membranski markeri CD63 i CD66b se u tom trenutku mogu uočiti na mestu fagocitoze. Azurofilne granule se najčešće fuzionišu sa fagozomom na mestu njegovog formiranja dok specifične granule se spajaju sa fagozomom na svakoj lokaciji u kojoj se fagozom nađe unutar citoplazme. Nakon formiranja fagozoma, uočeno je povećanje pH do stadijuma alkalne sredine nakon čega sledi postepeni pad pH fagozoma (Segal i sar., 1981; Nordenfelt i Tapper, 2011).

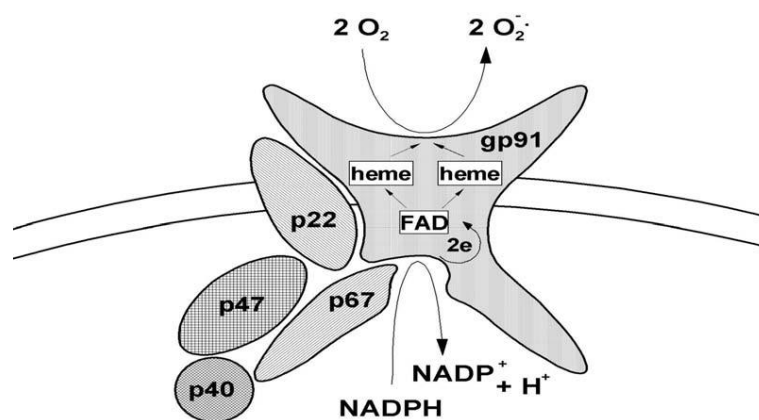
U isto vreme, sa unošenjem materija u fagozom neutrofilnih granulocita, unutarćelijski signali aktiviraju serijsku interakciju fagozoma sa endocitnom mrežom i

izmenom ekspresije specifičnih gena, posebno onih koji kodiraju produkciju citokina. Takođe, dolazi do snažnog oksidativnog praska unutar fagozoma pod uticajem NADPH-zavisnih oksidaza što dovodi do generisanja visoko toksičnih ROS. Zajedno sa sadržajem neutrofilnih granula, ROS imaju veoma važnu ulogu u ubijanju patogenih bakterija (Roos i sar., 2003).

2.2.3.4.5. Oksidativni (respiratorni) prasak neutrofilnih granulocita

Oksidativni prasak (respiratorni prasak) (engl. *respiratory burst; oxidative burst*) je, uopšteno gledajući, centralni aspekt biologije neutrofilnih granulocita. To je proces u kome se nakon formiranja fagozoma, pod uticajem NADPH oksidaze, generiše velika količina reaktivnih kiseonikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS). NADPH oksidaza pripada familiji NOX enzima (Segal i sar., 2008) od kojih je u generisanju ROS svakako najpotentnija NADPH oksidaza neutrofilnih granulocita (NOX2). Različite NOX enzime i njihovu ulogu u generisanju ROS, kako u neutrofilni granulocitima tako i u drugim ćelijama i tkivima, opisao je Lambeth (2004).

U svojoj aktivnoj formi, fagocitna NADPH oksidaza je elektronski transportni lanac koji se sastoji od biološkog spajanja citozolnih proteina (p40phox, p47phox, i p67phox i Rac 1/2) sa membranskim kompleksom citohrom b558 koji formiraju dve subjedinice, gp91phox i p22phox (slika 24) (Nauseef, 2004; Cross i Segal, 2004). Protein gp91phox je katalitički centar NADPH oksidaze koji ima dva molekula hema i jedan molekul FAD. Najveća količina membranski vezanog kompleksa citohrom b558 se nalazi u membrani specifičnih granula (85%) (Borregaard i Tauber, 1984), a manje količine su vezane za membranu sekretornih vezikula (10%) i plazma membranu (Sengelov i sar., 1992).



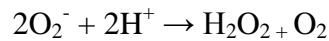
Slika 2.24. Prikaz molekula aktivisane NADPH oksidaze (Roos i sar., 2003)

Respiratorni prasak na plazma membrani se može indukovati rastvorljivim agonistima, dok se stvaranje NADPH kompleksa, prvo na membrani, a zatim na fagozomu indukuje samim procesom fagocitoze (Dahlgren i Karlsson, 1999). Nakon aktivacije oksidaze, citozolne komponente p40^{phox}, p47^{phox}, i p67^{phox} se vezuju sa gp91^{phox} (NOX2) i p22^{phox} na membrani fagozoma. Za formiranje aktivnog NADPH kompleksa neophodno je i vezivanje citozolnih Rac 1 ili Rac 2 proteina (Vignais, 2002). Rac 2 protein je neophodan tokom fagocitoze koja je indukovana vezivanjem neutrofilnih granulocita za patogene koji su opsonizovani imunoglobulinima G klase (Kim i Dinauer, 2001). U citozolu postoji konstantna regeneracija NADPH koji nastaje u pentozo - fosfatnom putu i koji se koristi kako za reakcije plazma membrane tako i za oksidativni prasak.

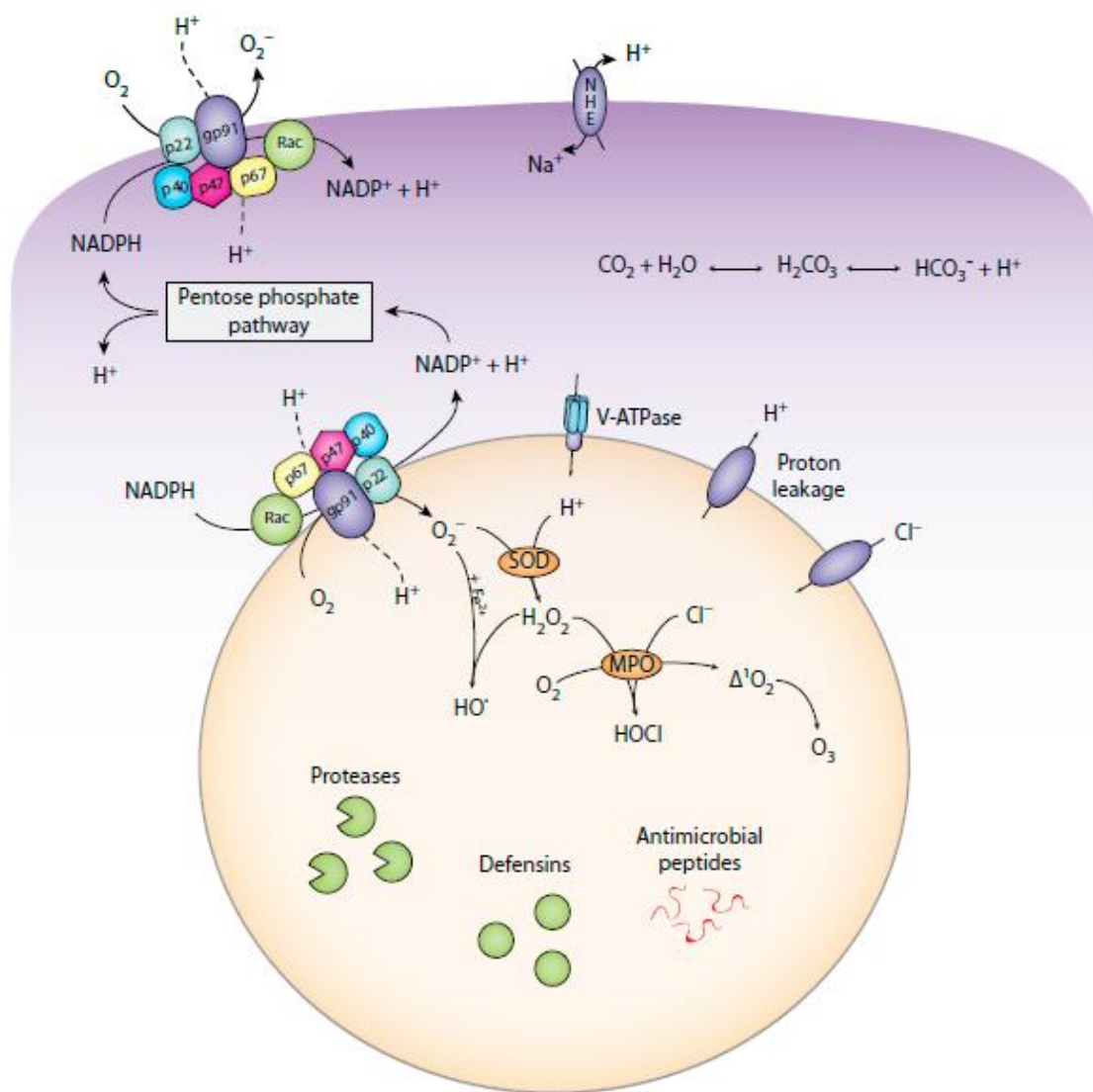
Aktivacija NADPH oksidaze rezultira redukcijom molekularnog kiseonika u superoksidni jon u reakciji:



Spontana dismutacija superoksida ili uticaj katalitičke reakcije mijeloperoksidaze (MPO) transformiše superoksid u vodonik peroksid (H₂O₂):



Citotoksična aktivnost superoksidnog jona i vodonik peroksida leži u njihovoj sposobnosti da reaguju sa mikrobicidnim komponentama sistema kao što su hipohlorna kiselina (HOCL) ili azotni oksid (NO₂) i generišu ostale reaktivne kiseonikove vrste (ROS) kao što su hidroksilni radikali (-OH), singlet kiseonik (-O₂) i ozon (O₃) (Beckman i sar., 1990; Ramos i sar., 1992; Wentworth i sar., 2002). Takođe, mijeloperoksidaza (MPO) neutrofilnih granulocita koristi vodonik peroksid (H₂O₂) kao supstrat za reakciju sa hloridnim i bromidnim jonima za stvaranje hipohlorne (HOCL) i hipobromne (HOBR) kiseline (slika 2.25) (Hampton i sar., 1998).



Slika 2.25. Stvaranje ROS u fagozomu neutrofilnih granulocita (Nordenfelt i Tapper, 2011)

Obe kiseline, i HOCl i HOBr su jaki oksidansi koji reaguju sa velikim brojem bioloških molekula kao što su proteini, nukleinske kiseline, ugljeni hidrati i masti. Isti autori naglašavaju da je HOCl oksidans neutrofilnih granulocita sa najizraženijim baktericidnim delovanjem koji lako sprečava replikaciju DNK. Hipohlorna kiselina može da reaguje sa aminokiselinama, odnosno sekundarnim aminima, najčešće taurinom, pri čemu se stvaraju hloramini koji su mikrobicidna jedinjenja sa aktivnošću jednakoj hipohlornoj kiselini i uz to su daleko stabilniji (Winterbourn, 1990). MPO- H_2O_2 sistem dovodi do formiranja radikala tirozina pri čemu se stvaraju reaktivni aldehidi, tirozin peroksid (Hazen i sar., 1998), kao i do oksidacije serumskih proteina i masti (Heinecke, 1999). Azotni oksid u neutrofilnim

granulocitima često reaguje sa kiseonikom pri čemu dolazi do stvaranja azot dioksida, takođe jakog oksidansa. Međutim, Beckam i Koppenol (1996) naglašavaju da su oba oksida azota slabo toksična jedinjenja i da se najznačajnija toksična aktivnost azotnih oksidativnih jedinjenja dobija tek nakon reakcije sa superoksidnim jonima i stvaranja peroksinitrata.

Najveći broj podataka o oksidativnom prasku i NADPH oksidazi je dobijen ispitivanjem ljudi deficijentnim u ovom enzimskom kompleksu, koji imaju granulomatoznu bolest (CGD). Usled genetskih defekata u nekoj od phox subjedinica gena, fagociti osoba sa CGD nemaju mogućnost stvaranja ROS (Segal i Abo, 1993). Utvrđeno je da 60-80% slučajeva CGD nastaje usled defekta $\text{gp91}^{\text{phox}}$ gena, 30% usled autozomalno recesivne p47^{phox} deficijencije dok tek negde oko 2-3% slučajeva nastaje zbog p22^{phox} i p67^{phox} autozomalno recesivne deficijencije (Roos i sar., 1996). Fagocitna sposobnost neutrofilnih granulocita sa deficijencijom nekog od ovih gena je normalna, ali ovakvi neutrofilni granulociti (ali i drugi fagociti) nisu u stanju da proizvode ROS i ubijaju target ćelije. Osobe sa CGD često imaju ozbiljne bakterijske i gljivične infekcije kao i granulomatozne pojave u tkivima. Izuzetak su infekcije u kojima same bakterije stvaraju značajne količine vodonik peroksida (H_2O_2) kao što su pneumokoke, pri čemu je stvoreni H_2O_2 dovoljan za aktivnost MPO- H_2O_2 sistema i stvaranje hlornih jedinjenja. Ozbiljnost kliničke slike osoba sa CGD jasno demonstrira značaj NADPH oksidaze u odbrani od patogenih mikroorganizama.

ROS takođe učestvuju u aktiviranju proteaza neutrofilnih granula (Reeves i sar., 2002; Ahluwalia i sar., 2004). NADPH oksidaza prenosi elektrone i na taj način vrši depolarizaciju membrane fagozoma. Da bi se kompenzovala razlika u električnom naboju dolazi do ulaska jona kalijuma preko K^+ kanala (BK kanala). Proizvodnja ROS i influks K^+ su ključni za stabilizaciju katjonskih proteina granula. Rada i sar. (2004) smatraju da su elektrofiziološke promene kao i stvaranje ROS direktno odgovorni za mikrobicidno delovanje.

2.2.3.4.6. Vanćelijske neutrofilne mreže (engl. *neutrophil extracellular traps*, NETs)

Neutrofilni granulociti su veoma efikasne fagocitne ćelije koje patogene mikroorganizme hvataju, drže u fagozomima u koje ubacuju sastojke svojih granula sa antimikrobnim delovanjem. Unutar fagolizozoma mikroorganizmi su izloženi velikom broju enzima, uključujući lizozim koji razlaže bakterijske membrane, različitim proteazama, fosfolipazama, katjonskim proteinima kao što je BPI (engl. *bactericidal permeability-*

increasing), defenzinima i katelicidinima. U isto vreme, NADPH oksidaza membrane fagozoma generiše reaktivne oksidativne vrste kao što su superoksid i vodonik peroksid i oni ulaze u lumen fagolizozoma u kojima vrše antimikrobnu aktivnost.

Do pre nekoliko godina se mislilo da neutrofilni granulociti koriste dva pomenuta mehanizma ubijanja mikroorganizama: sadejstvo sastojaka neutrofilnih granula i generisanje reaktivnih oksidativnih vrsta (Amulic i sar., 2012). Brinkman i sar. (2004) su opisali treći mehanizam neutrofilnih granulocita kojim ove ćelije imobilišu, hvataju i ubijaju bakterije. Kao odgovor na inflamatorni stimulus neutrofilni granulociti izbacuju strukturu sličnu mreži, a koja je mešavina njihovog nukleusnog sadržaja i sadržaja njihovih granula pri čemu ovakva struktura služi za hvatanje patogenih mikroorganizama. Isti autori ovakve mrežaste strukture za hvatanje mikroorganizama nazivaju vanćelijske neutrofilne mreže (engl. *neutrophil extracellular traps*, NETs). Direktna uticaja NETs potiče od kombinovanog delovanja proteina granula, histona i nekih citoplazmatskih proteina. Osim njihove protektivne funkcije ustanovljeno je da NETs imaju ulogu i u patogenezi mnogih bolesti (Medina, 2009; Kaplan i Radic, 2012).

Vanćelijske neutrofilne mreže (zamke) su građene od dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) jedra ili mitohondrija kao glavnog gradivnog elementa za koji se vezuju antimikrobni peptidi, enzimi i histoni (von Kockritz-Blickwede i Nizet, 2009). Neki drugi autori (Pilszczek i sar., 2010) naglašavaju da DNK mitohondrija sačinjava veoma mali deo NETs. Osnovu vanćelijskih neutrofilnih mreža čine lanci DNK debljine oko 17nm (Brinkman i sar., 2004) upakovani u modifikovane nukleozome (Urban i sar., 2006).

Jedan od gradivnih elemenata neutrofilnih vanćelijskih mreža su enzimi primarnih, sekundarnih i tercijarnih granula neutrofilnih granulocita, kao što su elastaza, katepsin G, laktoferin i želatinaza (Brinkman i sar., 2004). Ovi autori navode da proteini jedra kao što su lamin B, NP-45 i poli-polimeraza (PARP) nisu sastojak NETs. Takođe, isti autori isključuju prisustvo membranskih proteina i citoplazmatskih proteina aktina i tubulina unutar NETs dok nalaze da su histoni H1, H2A, H2B, H3 kao i kompleks H2A-H2B-DNK sastavni deo njihove strukture. Von Kockritz-Blickwede i Nizet (2009), slično prethodnim autorima, nalaze da membranski markeri CD16 i CD15, citoplazmatski marker kaspaza 3 i mitohondrijalni markeri citohrom C i Smac nisu deo kompleksa vanćelijskih neutrofilnih mreža.

Uprkos činjenici da dolazi do mešanja ćelijskih odeljaka tek je nešto više od 30 proteina prisutno u vanćelijskim neutrofilnim mrežama. Najveći broj ovih proteina vodi poreklo iz granula, mali broj iz jedra, a proteini citoplazme veoma retki (Urban i sar., 2009).

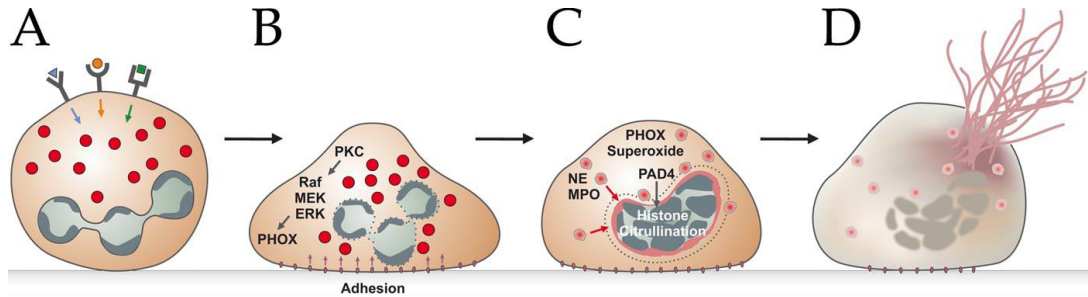
NETs su rezultat jedinstvenog procesa ćelijske smrti koji se razlikuje i od nekroze i od apoptoze a karakteriše se gubitkom unutarćelijskih membrana pre nego što dođe do prekidanja integriteta plazma membrane (Darrah i Andrade, 2012). Steinberg i Grinstein (2007) ovaj proces ćelijske smrti neutrofilnih granulocita uz formiranje vanćelijskih neutrofilnih mreža nazivaju NET-oza.

Opisan je veliki broj fizioloških induktora NET-oze. U prvom opisu procesa oslobađanja vanćelijskih neutrofilnih mreža Brinkman i sar. (2004) opisuju ovu pojavu nakon aktivacije neutrofilnih granulocita forbol miristat acetatom (PMA), lipopolisaharidima (LPS), interleukinom 8 (IL-8) kao i Gram + i Gram - bakterijama.

Lista fizioloških i sintetskih molekula, a i mikroorganizama i njihovih produkata koji mogu da aktiviraju neutrofilne granulocite na NETozu se konstantno povećava. Osim onih supstanci i mikroorganizama koje su pomenuli Brinkman i sar. (2004) svakako da se u najznačajnije aktivatore oslobađanja NETs mogu ubrojiti i različite gljivice i virusi, M1 protein *S. pyogenes*, leukocidin, vodonik peroksid, azotni oksid (NO), IFN- γ + C5a i faktor aktivacije trombocita (PAF). Zanimljivo je da su antitela (Kessenbrock i sar., 2009) i antigen-antitelo kompleksi mogući ali i veoma neefikasni aktivatori stvaranja vanćelijskih neutrofilnih mreža (Garcia-Romo i sar., 2011; Lande i sar., 2011).

Do danas su opisana dva mehanizma oslobađanja neutrofilnih vanćelijskih neutrofilnih mreža. U prvom NETs mehanizmu, neutrofilni granulociti ih oslobađaju u procesu sporog mehanizma ćelijske smrti. Ovo je najčešći mehanizam koji dovodi do njihovog formiranja. Do oslobađanja NETs u procesu spore ćelijske smrti dolazi tek nakon dramatičnih morfoloških promena aktiviranih neutrofilnih granulocita. Par minuta nakon aktivacije neutrofilnih granulocita (slika 2.26 A) oni se čvrsto adheriraju za supstrat i dobijaju spljošten oblik (slika 2.26 B). Tokom sledećeg časa jedro neutrofilnih granulocita gubi reznjevitost, hromatin se dekonduzuje i dolazi do progresivnog odvajanja spoljašnje i unutrašnje jedarne membrane. U isto vreme dolazi do dezintegracije neutrofilnih granula. Nakon jednog časa od aktivacije, jedarni omotač se dezintegriše uz stvaranje vezikula a nukleoplazma i citoplazma formiraju homogenu masu. Na kraju procesa, ćelija prvo dobija

okrugao oblik a zatim dolazi do njene kontrakcije sve do pucanja plazma membrane i izbacivanja ćelijskog sadržaja u vanćelijski prostor i formiranja vanćelijskih neutrofilnih mreža (NETs) (Fuchs i sar., 2007) (slika 2.26 C).



Slika 2.26. Shematski prikaz NET-oze (Brinkmann i Zychlinsky, 2012)

Važan momenat u procesu NETs je dekondezacija hromatina i hipercitrulinacija histona u reakciji koju katalizuje peptidil arginin deiminaza (PAD4) u kojoj se arginini histona konvertuju u citruline u procesu deiminacije. Hipercitrulinacija histona je zabeležena pri formiranju NETs, ali do nje ne dolazi pri apoptozi neutrofilnih granulocita (Neeli i sar., 2008; Wang i sar., 2009). Kod miševa koji ne proizvode enzim PAD4 ne dolazi do stvaranja NETs nakon aktivacije neutrofilnih granulocita različitim stimulusima i ovi neutrofilni granulociti ne mogu da ubijaju bakterije stvarajući ove mreže (Li i sar., 2010; Hemmers i sar., 2011).

NET-ozu je ireverzibilan proces koji zavisi od aktivnosti NADPH oksidaze (NOX2) neutrofilnih granulocita i stvaranja reaktivnih kiseonikovih vrsta (ROS) kao što su superoksidi. Neutrofilni granulociti osoba sa hroničnom granulomatoznom bolešću (CGD) u kojoj dolazi do disfunkcije NADPH oksidaze, ne mogu da generišu vanćelijske neutrofilne mreže (Fuchs i sar., 2007; Palic i saradnici, 2007). Takođe, u formiranje NETs se uključuje i nekoliko enzima koji regulišu aktivnost enzima NOX 2, kao što su izoforme protein kinaze C (PKC) i MAPK kinaze (Munafa i sar., 2009; Webster i sar., 2010). Međutim, receptori koji su okidač oslobađanja vanćelijskih neutrofilnih mreža i molekularni mehanizmi kojima reaktivne kiseonikove vrste (ROS) dovode do ovog procesa i dalje nisu sasvim razjašnjeni. Mijeloperoksidaza (MPO) koja koristi vodonik peroksid (H_2O_2) za generisanje hipohlorita i ostalih halidnih jona (Akong-Moore i sar., 2012) je takođe neophodna za proces NET-oze,

iako mehanizam uticaja MPO na stvaranje vanćelijskih neutrofilnih mreža nije dovoljno poznat. Dosadašnja saznanja sugerišu da produkti delovanja MPO nisu uključeni u NET-ozu jer ne indukuju stvaranje NETs i inhibitori MPO samo usporavaju stvaranje mreža (Metzler i sar., 2011). Eksperimenti ovih autora sa neutrofilnim granulocitima pacijenata sa parcijalnom deficijencijom MPO dokazuju da je i 5% aktivnosti ovog enzima dovoljno za NET-ozu. Smatra se da MPO učestvuje u formiranju vanćelijskih mreža u sinergiji sa neutrofilnom elastazom (NE). Neutrofilna elastaza pod uticajem ROS izlazi iz azurofilnih granula u citoplazmu i translocira se u jedro u kome delimično razlaže histone. Ovaj proces dovodi do relaksacije i dekonenzacije hromatina (Papayannopoulos i sar., 2010). Farmakološka inhibicija neutrofilne elastaze blokira formiranje NETs. Sinergizam MPO i NE u dekonenzaciji hromatina osigurava da se antimikrobne komponente NETs ne razlože od strane NE tokom rane faze dekonenzacije DNK. MPO ulazi u jedro nakon NE i na taj način pojačava dekonenzaciju hromatina a prema Palme-u i sar. (2012), hipohlorna kiselina koja je proizvod enzimskog delovanja MPO je dovoljna za stimulisanje NETs od strane neutrofilnih granulocita ljudi.

Pilsczek i sar. (2010) opisuju drugi mehanizam oslobađanja NETs u kome neutrofilni granulociti vrše ekspulziju nuklearnog sadržaja bez smrtnog ishoda. Ovi autori opisuju mehanizam u kome neutrofilni granulociti stimulisani bakterijom *Staphylococcus aureus* u *in vitro* uslovima brzo izbacuju vezikule sa dekonenzovanim hromatinom i antimikrobnim proteinima granula u vanćelijski prostor nakon čega se formiraju vanćelijske mreže. Ovaj proces se odvija brzo, u roku od 5-60 minuta za razliku od mehanizma spore ćelijske smrti neutrofilnih granulocita koji traje između 120 i 140 minuta. Isti mehanizam oslobađanja NETs je opisan i kod stimulacije neutrofilnih granulocita bakterijom *Streptococcus pyogenes*. Obe strategije formiranja vanćelijskih neutrofilnih mreža (NETs) zavise od stimulacije neutrofilnih TLR2 i C3 receptora. Ukoliko je neki od ovih receptora defektan, ne dolazi do formiranja NETs. Međutim, prema rezultatima koje su dobili Yipp i sar. (2012), TLR2 ligandi i C3a nisu bili dovoljni za indukovanje stvaranja NETs kod izolovanih neutrofilnih granulocita, čime se sugeriše da su u ovaj proces uključeni i neki drugi medijatori ili neki drugi kompleksni mehanizmi.

Osim neutrofilnih granulocita i eozinofilni granulociti, mastociti i makrofagi imaju sposobnost formiranja vanćelijskih mreža. Eozinofilne granulocite aktiviraju slični stimuli, ali za razliku od neutrofilnih granulocita, osnova vanćelijske mreže eozinofilnih granulocita

je mitohondrijalna DNK što im omogućava da prežive formiranje ovih mreža (Yousefi i sar., 2009). Oslobođanje vanćelijskih mreža kod mastocita je slično kao kod neutrofilnih granulocita, uz oslobođanje ROS, pri čemu dolazi do smrti ćelije (von Kockritz-Blickwede i sar., 2008).

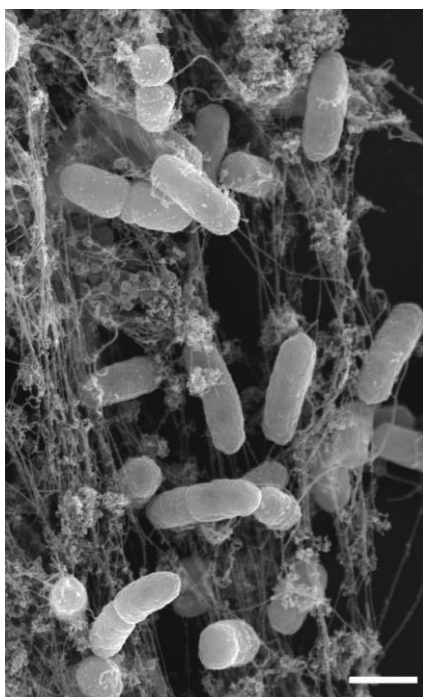
Vanćelijske neutrofilne mreže sadrže gotovo sve antimikrobne faktore neutrofilnih granulocita koji se oslobođaju i degranulacijom. Stoga se postavlja pitanje da li je uloga histona zaista toliko velika da bi neutrofilni granulociti koristili mehanizam oslobođanja NETs. Najvažnija uloga neutrofilnih granulocita je eliminacija mikroorganizama. Stoga se do skoro smatralo, da vanćelijske neutrofilne mreže predstavljaju samo mehanizam kojim se patogeni, kao što i samo njihovo ime kaže "hvataju u mrežu", čime se sprečava njihovo širenje po organizmu, vrši inaktivacija njihovih faktora virulencije i na kraju njihovo uništavanje. Međutim, ovo nije njihova jedina uloga i korišćenje NETs od strane neutrofilnih granulocita se pokazalo kao velika prednost a njihova uloga se može sumirati u sledećem:

1. predstavljaju fizičku barijeru širenju infekcije,
2. omogućavaju sinergizam i povećavaju efektivnu koncentraciju sprečavanjem difuzije antimikrobnih komponenti neutrofilnih granulocita,
3. minimiziraju oštećenja sopstvenih tkiva destruktivnim delovanjem proteina granula,
4. moduliraju inflamatorni imunski odgovor

Fizička barijera i zadržavanje mikroorganizama je takođe i odlika fagocitoze. Međutim, fagocitoza zahteva konstantnu hemotaksu i određenu količinu energije za svoje odvijanje. Vanćelijske neutrofilne mreže hvataju patogene bez ikakvog energetskog utroška. Takođe, prema Zhang-u i sar. (2003) funkcija NETs može trajati mnogo duže nego sama sposobnost neutrofilnih granulocita da vrše fagocitozu. Površina koju NETs zauzimaju u međućelijskom prostoru im omogućava da spreče širenje patogena, ali i njihovo veoma lako hvatanje (slika 2.27).

Osim komponenti granula neutrofilnih granulocita, histoni vanćelijskih neutrofilnih mreža učestvuju u ubijanju i Gram + i Gram - bakterija, ali i parazita (Wang i sar., 2011). Jedan mol histona može da ubije 100 puta više bakterija nego ista količina antimikrobnih supstanci granula kao što je defenzin. Mehanizam toksičnosti histona nije sasvim jasan, mada

se pretpostavlja da im njihova katjonska priroda omogućava vezivanje za membrane bakterija čime se one uništavaju ili čine propustljivim za druge antimikrobne faktore. Kawasaki i sar. (2008) su utvrdili da se fragmenti histona mogu lako vezati za DNK prokariotskih ćelija, Lemaire i sar. (2008) naglašavaju da ova njihova osobina interferira sa aktivnošću enzima giraze. Međutim Xu i sar. (2009) su utvrdili da histoni oštećuju i ćelije eukariota, posebno sisara, čime se naglašava njihova uloga u patogenezi sepse i kolateralnom oštećenju okolnih tkiva prilikom infekcije.



Slika 2.27. Elektronska mikroskopija - Bakterije iz roda *Salmonella* uhvaćene u vanćelijske neutrofilne mreže (Brinkmann i Zychlinsky, 2012)

2.2.3.4.7. Mehanizmi rezistencije mikroorganizama na dejstvo neutrofilnih granulocita

Patogene bakterije i gljivice su evoluirale na taj način da im njihovi mehanizmi omogućavaju da se bore protiv dejstva neutrofilnih granulocita. Glavne strategije koje patogeni mikroorganizmi primenjuju se mogu podeliti u šest kategorija:

1. opšta strategija preživljavanja,
2. izbegavanje kontakta sa ćelijama imunskog sistema,
3. sprečavanje fagocitoze,

4. strategija preživljavanja unutar neutrofilnih granulocita,
5. indukovanje smrti fagocitnih ćelija i
6. izbegavanje vanćelijskih neutrofilnih mreža (NETs) i njihovog toksičnog efekta.

Transkripciona analiza genoma patogenih bakterija omogućila je uvid u odgovor ovih mikroorganizama na dejstvo neutrofilnih granulocita (Rubin-Bejerano i sar., 2003; Voyich i sar., 2003; Voyich i sar., 2004; Fradin i sar., 2005; Voyich i sar., 2005). Mikroorganizmi kao što su *Candida albicans*, *Streptococcus pyogenes* i *Staphylococcus aureus*, kada su fagocitovani, vrše ekspresiju gena odgovornih za otpornost prema oksidativnom stresu. Dokazano je da sojevi *C. albicans* i *Pseudomonas aeruginosa* imaju manju virulentnost ukoliko nemaju gene oksidativnog stresa (Martchenko i sar., 2004; Lau i sar., 2005).

Nakon što ih makrofagi fagocituju, ćelije *C. albicans* indukuju rast hifa unutar fagozoma Mansour i Levitz (2002), što rezultira destrukcijom makrofaga i izlaskom *C. albicans*. Nasuprot ovome, unutar fagozoma neutrofilnih granulocita, *C. albicans* ne može da formira filamentozne forme, njen rast je blokiran i na kraju umire unutar fagozoma. Međutim, ova gljivica je vremenom razvila specifičan mehanizam kojim preživljava fagocitozu i na osnovu koga je otporna na toksično delovanje neutrofilnih granulocita (Rubin-Bejerano i sar., 2003). Nakon kontakta sa neutrofilnim granulocitima, ali ne i sa drugim ćelijama krvi (Fradin i sar., 2005) *C. albicans* vrši pojačanu ekspresiju nekoliko gena oksidativnog stresa kao što su geni za supeksid-dismutazu (SOD), katalazu (CAT) i glutation-peroksidazu (GPX) (Rubin-Bejerano i sar., 2003) koji neutrališu oksidativni arsenal neutrofilnih granulocita. Može se reći da su patogeni koji imaju visoku toleranciju na oksidativni stres otporniji na dejstvo neutrofilnih granulocita. Stoga se može zaključiti da je inaktivacija reaktivnih oksidativnih vrsta (ROS) koje proizvodi NADPH oksidaza neutrofilnih granulocita, mehanizam virulencije izbegavanja imunskog odgovora. Ovakvi rezultati su u skladu i sa istraživanjima Liu i sar. (2005) koji su dokazali da je pigment *S. aureus* jedan od faktora virulencije koji učestvuje u preživljavanju ove bakterije unutar fagozoma tako što vezuje ROS.

Patogeni mikroorganizmi imaju dve različite strategije izbegavanje kontakta sa neutrofilnim granulocitima. Prvo, patogeni odlaze na mesta gde su nedostupni fagocitnim ćelijama. Tako, *Listeria monocytogenes* indukuje sopstvenu endocitozu od strane epitelnih ćelija i na taj način izbegava susret sa fagocitnim ćelijama (Pizarro-Cerda i Cossart, 2006).

Druga strategija patogenih bakterija i gljivica je sprečavanje migracije neutrofilnih granulocita na mesto infekcije. Patogena gljivica *Blastomyces dermatitis* smanjuje produkciju tumor nekrotičnog faktora alfa (TNF- α) i na taj način inhibira aktivaciju monocita i neutrofilnih granulocita (Finkel-Jimenez i sar., 2002). Bakterija *Staphylococcus aureus* vrši sekreciju proteina koji je inhibitor hemotakse (CHIPS) i vezuje formil peptidne i C5a receptore na neutrofilnim granulocitima čija je aktivacija esencijalna za njihovu migraciju na mesto infekcije (De Haas i sar., 2004). Kapsulirana gljivica *Cryptococcus neoformans* luči kapsularnu komponentu glukuroksilomanan (GXM) koji smanjuje ekspresiju L selektina (CD 62L) (Dong i Murphy, 1996) i TNF- α receptora (Ellerbroek i sar., 2004) na površini neutrofilnih granulocita i na oba načina sprečava migraciju neutrofilnih granulocita.

Bakterije i gljivice koriste tri različita mehanizma da bi sprečili fagocitozu:

- fizičke barijere kao što su polisaharidna ili poliglutamat kapsula koje sprečavaju prepoznavanje receptora od strane fagocitnih ćelija,
- interferiranje sa opsonizacijom i
- inhibiciju aktinskog citoskeleta

Uropatogena *Escherichia coli* koristi svoje kapsularne antigene O75 i K5 koji sprečavaju prepoznavanje od strane fagocitnih ćelija i na taj način povećava svoju otpornost na fagocitozu (Burns i Hull, 1999). *Staphylococcus aureus* luči inhibitor komplementa SCIN koji smanjuje opsonizaciju komplementom tako što se vezuje za C3 konvertazu (Rooijackers i sar., 2005). Gram negativne bakterije *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* i *Yersinia enterocolitica* koriste treći način sprečavanja procesa fagocitoze. Ove bakterije nakon ulaska u organizam luče efektorske proteine koji deluju na dendritične ćelije, makrofage i neutrofilne granulocite (Marketon i sar., 2005). Četiri efektorna proteina, YopE, YopH, YopT i YopO inhibiraju aktinski citoskelet čime se sprečava proces fagocitoze (Gruenheid i Finlay, 2003).

Mnoge bakterije i gljivice mogu da prežive u neutrofilnim granulocitima nakon što su fagocitovane. *Anaplasma phagocytophilum*, ali i druge vrste iz familije *Ehrlichia*, čak i koriste neutrofilne granulocite kao ćelije u kojima se razvijaju i u kojima preživljavaju. Ove strategije preživljavanja su inhibicija fuzije fagozoma i lizozoma, preživljavanje u fagolizozomu i izlazak iz citoplazme. Smatra se da bakterija *Streptococcus pyogenes* koristi

sve tri strategije da bi preživela unutar fagocitnih ćelija (Cunningham, 2000). Streptokokni protein M i njemu slični proteini ove bakterije, sprečavaju degranulaciju ali i fuziju fagozoma sa azurofilnim granulama (Staali i sar., 2006). Isti autori navode da *S. pyogenes* koristi neutrofilne granulocite da bi se zaštitio od ostalih ćelija imunskog odgovora. Proteini H i M im omogućavaju preživljavanje unutar fagozoma štiteći ih od uticaja oksidativnog praska. Takođe, prema Medina i sar. (2003) debela kapsula ove bakterije, osim što joj omogućava da izbegne toksične mehanizme neutrofilnih granulocita, u isto vreme joj i dozvoljava da izađe iz fagozoma i neutrofilnih granulocita.

Streptococcus pyogenes (Sierig i sar., 2003; Miyoshi-Akiyama i sar., 2005), *Clostridium perfringens* (Stevens i sar., 1987) i *Staphylococcus aureus* luče toksine koji ubijaju neutrofilne granulocite. Prisustvo tih toksina je u korelaciji sa virulentnošću ovih bakterija (Patel i sar., 1987). *S. aureus* vrši ekspresiju dva tipa toksina koji kod ćelija dovode do stvaranja pora (engl. *pore-forming toxins* - PFT) i to α -haemolizin i leukotoksine (Luk). Postoje četiri forme leukotoksina *S. aureus* i to: γ -hemolizin, leukocidin E/D, leukocidin sličan M/PV i Panton-Valentine leukocidin (PVL) (Menestrina i sar., 2001). Alfa toksin ove bakterije se može naći kod gotovo svih, dok se Panton-Valentine leukocidin (PVL) nalazi samo kod 1-2% izolovanih sojeva (Foster, 2005). Nalaz PVL je u korelaciji sa virulentnošću ove bakterije i izazivanjem nekrotičnih promena na ćelijama. PVL kod neutrofilnih granulocita dovodi do nekroze pri višim koncentracijama ili indukuje apoptozu u nižim koncentracijama (Genestier i sar., 2005). Isti autori nalaze da ovaj toksin deluje na mitohondrije neutrofilnih granulocita čime se aktivira kaspaza-9 i kao posledica toga nastaje apoptoza neutrofilnih granulocita.

Mehanizmi rezistencije mikroorganizama na delovanje vanćelijskih neutrofilnih mreža (NET) tek se u skorije vreme značajnije izučavaju. Do sada je opisano pet mehanizama ove rezistencije (von Kockritz-Blickwede i Nizet, 2009):

- stvaranje polisaharidne capsule,
- promena električnog naboja površine ćelije,
- stvaranje biofilma,
- inhibicija stvaranja NETs putem produkcije peptidaza i DNK-aza i
- inhibicija stvaranja ROS koji su esencijalni za NET-ozu.

Wartha i sar. (2007) opisuju ulogu polisaharidne kapsule pneumokoka, pri čemu naglašavaju njenu ulogu u sprečavanju hvatanja bakterija putem neutrofilnih mreža. Lauth i sar. (2009) nalaze da M1 protein streptokoka grupe A, osim što doprinosi patogenosti bakterija, u isto vreme inicira stvaranje NETs i faktor je rezistencije na njih, tako što inhibira dejstvo katelicidina. Efekat stvaranja biofilma na otpornost prema vanćelijskim neutrofilnim mrežama izučavali su Thornton i sar. (2013), koji nalaze da je bakterijski biofilm u slučaju hronične upale srednje uha deteta bio odgovoran za rezistenciju na NETs. Slične rezultate prijavljuju i Hong i sar. (2009) u slučaju bakterije *Haemophilus influenzae*.

Nukleaze pripadaju grupi hidrolaza koje raskidaju fosfodiesterne veze unutar nukleinskih kiselina. Prisustvo ovakvih enzima kod bakterija i njihova sposobnost da vrše razlaganje nukleinskih kiselina doprinosi otpornosti na dejstvo vanćelijskih neutrofilnih mreža. Berends i sar. (2010) su dokazali da nukleaza deficijentni mutanti bakterije *Staphylococcus aureus* ne mogu da razlažu NETs i za razliku od divljih sojeva koji imaju ovu sposobnost, osetljivi su na delovanje neutrofilnih mreža.

Logters i saradnici (2009) su ispitivali uticaj bakterijskih katalaza na neutrofilne granulocite. Oni nalaze da katalaze razlažu vodonik peroksid na vodu i kiseonik i na ovaj način sprečavaju formiranje NETs.

2.2.3.4.8. Uloga neutrofilnih granulocita u odbrani mlečne žlezde

Veliki broj straživanja u oblasti imunologije mlečne žlezde objasnio je mehanizme odbrane mlečne žlezde od infekcija pri čemu se naglašava primarna uloga polimorfonuklearnih neutrofilnih granulocita (Burvenich i sar., 2003; Mehrzad i sar., 2005; Paape i sar., 2002).

Životni ciklus neutrofilnih granulocita goveda je relativno kratak. Nakon njihove geneze u kostnoj srži potrebno je 10-14 dana do njihovog sazrevanja (Burvenich i sar., 2003). Nakon sazrevanja, neutrofilni granulociti goveda mogu da budu deponovani u kostnoj srži još nekoliko dana i nakon toga napuštaju hematopoetski odeljak kostne srži, ulaze u vaskularni sinus i migriraju u krv. U krvi, poluživot neutrofilnih granulocita iznosi oko 9 časova (Carlson i Kaneko, 1975) nakon čega ulaze u tkiva u kojima vrše ulogu fagocita obično 1 do 2 dana.

Geneza i apoptoza neutrofilnih granulocita zdravih mlečnih krava su strogo regulisani, čime se njihov broj u krvi, mleku i tkivima održava konstantnim (Heyneman i Burvenich, 1992; Burvenich i sar., 2003; Paape i sar., 2002). Konstantan influks neutrofilnih granulocita je esencijalan element njihove odbrane mlečne žlezde.

Manlongat i sar. (1998) ukazuju na različitost mišljenja naučnika u pogledu prisustva jakih hemotaksičnih faktora u mleku krava koje nemaju upalu mlečne žlezde. Ipak ovi autori naglašavaju da se prisustvo ovih faktora u mleku krava sa mastitisom ne može osporiti. Indukcija stvaranja i oslobađanja najvećeg broja hemotaksičnih faktora se dešava tokom akutne infekcije mlečne žlezde. Međutim, Struyif i sar. (2001) utvrđuju da je određeni broj hemotaksičnih faktora (kao što je Regakin-1) konstantno prisutan u visokim koncentracijama u krvnoj plazmi. Tokom upale mlečne žlezde, inflamatorni hemoatraktanti vode neutrofilne granulocite ka uzroku infekcije.

Influks neutrofilnih granulocita u mlečnu žlezdu je regulisan akumulacijom hemotaksičnih faktora koji mogu biti endogenog ili egzogenog porekla. Endogeni hemotaksični faktori za neutrofilne granulocite uključuju komponente sistema komplementa (npr. C5a), leukotrijen B4, faktor aktivacije trombocita (PAF) i hemokine (najčešće IL-8). Egzogeni faktori aktivacije uključuju najčešće neke od bakterijskih komponenti, kao što je lipopolisaharid (LPS) Gram - bakterija. Prisustvo hemotaksičnih faktora utiče na dinamiku dijapedeze neutrofilnih granulocita kroz krvno-mlečnu barijeru i njihovu aktivnu fluktuaciju u mleko (van Oostveldt i sar., 2002). Hemoatraktanti se vezuju za specifične receptore na plazma membrani neutrofilnih granulocita, nakon čega neutrofilni granulociti adheriraju za endotel krvnih sudova i dolazi do njihove ekstravazacije u tkivo mlečne žlezde. Esencijalna uloga u ekstravazaciji neutrofilnih granulocita u mlečnoj žlezdi leži u ekspresiji CD11/CD18 adhezionih molekula na membrani ovih ćelija (Diez-Fraille i sar., 2004). Prema ovim autorima, smanjena ekspresija CD11/CD18 adhezionih molekula, dovodi do sporijeg i znatno težeg regrutovanja neutrofilnih granulocita u mlečnu žlezdu. Isti autori utvrđuju da *Escherichia coli* indukuje povećanu ekspresiju CD11/CD18 adhezionih molekula.

Citokini makrofaga i epitela mlečne žlezde utiču na funkciju neutrofilnih granulocita, kako u normalnim fiziološkim, tako i u patološkim stanjima mlečne žlezde (Boudjellab i sar., 1998). Barber i sar. (1999) smatraju da je od svih citokina najznačajnija uloga IL-8 u regrutovanju neutrofilnih granulocita, ali i T limfocita u mleko. Sa druge strane, sami

neutrofilni granulociti preko citokina koji sekretuju utiču na migraciju CD4+ i CD8+ limfocita na mesto inflamacije u mlečnoj žlezdi (Mehrzad i sar., 2008).

U slučajevima mastitisa, u mlečnu žlezdu se mobilisu milijarde neutrofilnih granulocita u odbrani od infekcije. Preko 20 miliona neutrofilnih granulocita po mililitru se može naći u mleku krava iz četvrti koje su zahvaćene kliničkim mastitisom. Međutim, i pored ogromnog broja polimorfonuklearnih neutrofilnih granulocita, patogene bakterije se mogu izolovati iz mleka nakon dužeg vremenskog perioda. Hronične infekcije mogu potrajati mesecima i tokom ovog perioda broj somatskih ćelija mleka može konstantno prelaziti 10^6 ćelija po mililitru mleka. (Rainard i Poutrel, 1982). Postoji nekoliko objašnjenja zašto neutrofilni granulociti čiji broj visoko prelazi broj patogenih bakterija u mleku ne mogu da eliminišu bakterije iz mlečne žlezde.

Neutrofilni granulociti su permanentno prisutni unutar mlečne žlezde i mleka, a muža ili sisanje mleka od strane teladi indukuju migraciju neutrofilnih granulocita iz krvi u mlečnu žlezdu. Neutrofilni granulociti goveda prolaze kroz epitel mlečne žlezde dijapedezom bez oštećenja epitela (Lin i sar., 1995), osim u slučaju ekstenzivne dijapedeze, kada neutrofilni granulociti mogu da proizrokuju i mehanička i hemijska oštećenja (Akers i Nickerson, 2011).

Postoje ubedljivi dokazi da je inflamatorna funkcija neutrofilnih granulocita, ali i drugih odbrambenih ćelija, u slučaju infekcija genetski determinisana i da zavisi i od rase goveda (Bannerman i sar., 2008). Kod mlečnih krava, koncentracija cirkulišućih neutrofilnih granulocita, tokom rane laktacije, zavisi od genetskih varijacija u okviru same rase (Riollet i sar., 2000). Iako je heritabilnost u slučaju mastitisa niska, ona može biti jedna od profilaktičkih mera u budućnosti (Wall i sar., 2005).

Fagocitna sposobnost neutrofilnih granulocita je smanjena u mlečnoj žlezdi (Paape i sar., 1979). Upoređivanjem fagocitne aktivnosti, utvrđeno je da je broj bakterija koje su uništili neutrofilni granulociti mleka, bio daleko manji nego što je to slučaj sa neutrofilnim granulocitima krvi. Takođe je utvrđena i manja vijabilnost neutrofilnih granulocita mleka nego što je to slučaj u krvi što zavisi od stadijuma laktacije i starosti samih neutrofilnih granulocita (Mehrzad i sar., 2002). Mleko ne sadrži dovoljno nekih materija koje su donekle esencijalne za pun kapacitet funkcije neutrofilnih granulocita. Utvrđeno je, da je nedostatak glukoze bio limitirajući faktor za fagocitozu bakterija *S. aureus* u mleku (Newbould, 1973). Neutrofilni granulociti mleka sadrže 38% manje deponovanog glikogena nego neutrofilni

granulociti krvi i stoga se ovaj nedostatak energije smatra jednim od faktora njihove smanjene fagocitne funkcije (Paape i sar., 1979).

Kapljice masti u mleku i kazein smanjuju fagocitnu sposobnost neutrofilnih granulocita (Paape i Guidry, 1977). Inhibitorna uloga ovih materija mleka se pripisuje korišćenju plazma membrane za formiranje fagozoma koji sadrže masti i kazein. Takođe, unutarćelijsko ubijanje bakterija se smanjuje u prisustvu masti i kazeina zbog smanjene funkcije fagozoma, odnosno fagolizozoma u prisustvu ovih materija.

Jedan od faktora koji utiče na smanjenu fagocitozu neutrofilnih granulocita mleka je mala koncentracija opsoninskih molekula. Fagocitna sposobnost neutrofilnih granulocita je najbolja kada su bakterije opsonizovane antitelima ili komplementom. Dodatak imunog seruma mleku dovodio je do povećane fagocitoze neutrofilnih granulocita. Isti efekat se može zapaziti u mleku imunizovanih krava kada je fagocitna funkcija neutrofilnih granulocita znatno veća (Guidry i sar., 1980).

Neutrofilni granulociti krvi i mleka imaju potencijal da proizvode velike količine ROS da bi ubijali fagocitovane bakterije (Mehrzađ i sar., 2009). Prema Burvenich i sar. (2003) stvaranje reaktivnih kiseonikovih vrsta je veoma efekasan način kojim fagociti ubijaju bakterije a naročito Gram - bakterije. Produkcija ROS se može izmeriti kako kod neaktivnih (nestimuliranih) neutrofilnih granulocita tako i kod neutrofilnih granulocita nakon njihove stimulacije sa forbol miristat acetatom (PMA), zimozanom, česticama lateksa ili celim bakterijama. Tehnika koja se najčešće koristi za merenje produkcije ROS, kod neutrofilnih granulocita, je hemiluminiscencija (CL) (Mehrzađ i sar., 2005). Tom prilikom dolazi do reakcije ROS sa luminiscencentnim komponentama i moraju biti prisutne membranska NADPH oksidaza i mijeloperoksidaza azurofilnih granula. Tokom proteklih godina, upoređivana je aktivnost neutrofilnih granulocita mleka i neutrofilnih granulocita krvi u stvaranju ROS, metodom hemiluminiscencije (CL). Paape i sar. (2002) smatraju da kapljice masti i micle kazeina utiču, kako na fagocitozu tako i na degranulaciju neutrofilnih granulocita, a posledično i na stvaranje ROS. Ovaj problem ne postoji kod neutrofilnih granulocita krvi. Dokazano je da dijapedeza polimorfonuklearnih neutrofilnih granulocita kroz epitel mlečne žlezde smanjuje produkciju ROS od strane ovih ćelija, ali i njihovu fagocitnu sposobnost (Smits i sar., 1996; Smits i sar., 1999). Takođe, postoji različitost u funkciji neutrofilnih granulocita krvi i neutrofilnih granulocita mleka (Mehrzađ i sar., 2002).

Neki od fizioloških faktora, kao što su stadijum laktacije (Mehrzad i sar., 2001) ili broj laktacija (Mehrzad i sar., 2009) utiču na funkcije neutrofilnih granulocita. Na baktericidnu sposobnost neutrofilnih granulocita utiče i prisustvo β -laktoglobulina (Mehrzad i sar., 2000) čija je koncentracija minimalna tokom rane laktacije.

Metodom hemiluminiscencije je utvrđeno da je oksidativni prasak neutrofilnih granulocita krvi i mleka znatno niži u fazi rane laktacije nego što je to u sredini laktacije (Mehrzad i sar., 2001). Takođe je odnos oksidativnog praska neutrofilnih granulocita mleka prema oksidativnom prasku neutrofilnih granulocita krvi, najniži odmah nakon teljenja dok je tokom srednje i kasne laktacije taj odnos gotovo podjednak. Ovo se podudara sa nalazima da su krave u ranoj laktaciji prijemčivije pojavi mastitisa nego krave u kasnijim fazama laktacije (Mehrzad i sar., 2001).

U nekim studijama je dokazana disfunkcija neutrofilnih granulocita kod prvotelkinja. Kehrl i sar. (1989) ukazuju na smanjenu migraciju i hemiluminiscenciju 7 dana nakon teljenja, a Dosogne i sar. (1999) navode da je kod krava oksidativni prasak neutrofilnih granulocita u periodu od prve do treće nedelje nakon telenja znatno smanjen.

Mehrzad i sar. (2009) su demonstrirali izrazito smanjenu fagocitnu i baktericidnu sposobnost neutrofilnih granulocita krvi i mleka u eliminaciji *S. aureus* kod krava koje su se više puta telile za razliku od prvotelkinja u ranoj laktaciji. Ovi autori smatraju da je ovo rezultat smanjene produkcije slobodnih radikala kiseonika.

Na oksidativni prasak neutrofilnih granulocita utiče i upotreba lekova nakon intramamarnе terapije. Utvrđeno je da enrofloksacin utiče na povećanje hemiluminiscencije (CL) pri merenju oksidativnog praska dok antimikrobni lekovi kao što su neomicin, linkomicin, streptomycin, oksitetraciklin, danofloksacin, penicilin, ceftiofur, spiramicin, eritromicin i hloramfenikol smanjuju oksidativni prasak neutrofilnih granulocita (Hoeben i sar., 1997a; Hoeben i sar., 1997b; Hoeben i sar., 1998). Zbog toga što je fiziološka funkcionalna sposobnost neutrofilnih granulocita u mleku već umanjena, kao rezultat ingestije komponenti mleka, upotreba antibiotika koji dodatno slabe funkcije neutrofilnih granulocita može biti kritična komponenta nepotpunog imunskog odgovora mlečne žlezde.

Disfunkcija, ili smanjena funkcionalna sposobnost neutrofilnih granulocita, je u korelaciji sa prijemčivošću krava na pojavu mastitisa (Burvenich i sar., 2003; Mehrzad i sar.,

2004). Ovi autori smatraju da je potreban veći broj istraživanja u ovoj oblasti, da bi se objasnili precizni mehanizmi koji učestvuju u smanjenoj funkciji neutrofilnih granulocita i prijemčivosti mlečnih krava na pojavu mastitisa.

2.2.4. Leukociti goveda i leukocitna formula

Interpretacija imunskog odgovora leukocita i njihov broj u krvi goveda, kao i kod ostalih vrsta životinja, može biti esencijalna komponenta dijagnoze, monitoringa i prognoze bolesti, iako se leukogram ne može smatrati metodom specifične dijagnostike. Promena broja leukocita kod goveda, kao odgovor na inflamatorne procese je u mnogo čemu slična kao kod ostalih vrsta domaćih životinja, dok se u pojedinim aspektima značajno razlikuje i ispoljava karakteristike vrste.

Goveda imaju manje rezerve granulocita u kostnoj srži u odnosu na druge vrste životinja. Odnos mijeloidne prema eritroidnoj lozi ćelija kostne srži kod goveda iznosi 0,5:1 (Bertram, 1985). Manja rezerva ćelija granulocitne loze je razlog neutropenije tokom gnojnih zapaljenjskih reakcija kod goveda. Nakon što dođe do ubrzanja granulopoeze dolazi do „levog” skretanja neutrofilnih granulocita i neutrofilije (Jain, 1986). Neutrofilni granulociti goveda imaju tri tipa citoplazmatskih granula. Treći tip granula su najveće granule koje zauzimaju znatno veći prostor unutar ćelije nego što je to kod ostalih domaćih životinja. One imaju snažniju antimikrobnu aktivnost nego citoplazmatske granule nepreživara. Citohemijskim i imunocitohemijskim bojenjima nađen je veliki broj enzima i supstrata u neutrofilnim granulocitima goveda (Arai i sar., 2003). Lizozim, enzim koji je karakterističan za veliki broj vrsta životinja nije dokazan u neutrofilnim granulocitima goveda.

Eozinofilni granulociti goveda imaju jedro sa dva režnja koje okružuje veliki broj malih, okruglih citoplazmatskih granula u bazofilnoj citoplazmi. Telad od 6 meseci, pa sve do sazrevanja, karakteriše dvostruko veći broj eozinofilnih granulocita. Kao i kod drugih životinja, paraziti i njihove larve dovode do eozinofilije.

Bazofilni granulociti goveda su slične veličine kao i eozinofilni granulociti, sa velikim brojem malih granula, koje ponekada prekrivaju jedro. Bazofilni granulociti se kod goveda nalaze u veoma niskim koncentracijama tako da se često ne detektuju pri citološkim analizama.

Monociti goveda su obično ovalnog ili nepravilnog oblika i 13-19 μm u prečniku. Imaju dvorežnjeviti ili ameboidni nukleus dok se u citoplazmi nalaze male, često neprimetne granule.

Kao i kod najvećeg broja životinja, novorođene jedinke imaju manji broj limfocita nego granulocita. U roku od par nedelja, broj limfocita se duplira da bi do starosti teleta od 3 meseca limfociti sačinjavali 70-80% ukupnog broja leukocita krvi.

Limfociti goveda su ćelije prečnika 8-15 μm . Postoje tri vrste limfocita na osnovu njihovog prečnika: mali, srednji i veliki limfociti. Tehnologija sortiranja ćelija omogućila je određivanje podtipova limfocita i njihovih citokina. Neki podtipovi limfocita imaju afinitet prema određenim anatomskim pozicijama u telu goveda, a zdravstveni status životinje rezultira u promeni podtipova limfocita koji se generišu u kostnoj srži (Bertram, 1985). Fiziološka varijabilnost kao što su fizička aktivnost ili stres mogu imati uticaja na hematološke vrednosti goveda. Uprkos najosetljivijoj tehnologiji koja se danas koristi, granice hematoloških parametara goveda i dalje ostaju uniformno široke. Referentne hematološke vrednosti goveda prikazane su u tabeli 2.2.

Tabela 2.2. Referentne vrednosti krvne slike goveda (Latimer, 2011)

Parametar	Apsolutna vrednost		Diferencijalna (relativna) leukocitarna formula
	Konvencionalne jedinice	Internacionalni sistem jedinica (ISI)	
Hemoglobin	8-15 g/dL	80-150	/
Hematokrit	24-46 %	0.24-0.46	/
Eritrociti	$5-10 \times 10^6/\mu\text{L}$	5.0-10.00	/
MCV	40-60 fL	40-60	/
MCH	11-17 pg	11.0-17.0	/
MCHC	30-36 (g/dL)	300-360	/
Trombociti	$100-800 \times 10^3/\mu\text{L}$	$100-800 \times 10^9/\text{L}$	/
MPV	3,5-6,5 fL	3,5-6,5 fL	/
Leukociti	$4000-12000/\mu\text{L}$	$4-12 \times 10^9/\text{L}$	/
Segmentirani neutrofilni granulociti	$600-4000/\mu\text{L}$	$0,6-4 \times 10^9/\text{L}$	25 - 62 %
Nezreli neutrofilni granulociti	$0-120/\mu\text{L}$	$0-0,12 \times 10^9/\text{L}$	/
Limfociti	$2500-7500/\mu\text{L}$	$2,5-7,5 \times 10^9/\text{L}$	29 - 66 %
Monociti	$25-840/\mu\text{L}$	$0-0,8 \times 10^9/\text{L}$	2 - 9 %
Eozinofilni granulociti	$0-2400/\mu\text{L}$	$0-2,4 \times 10^9/\text{L}$	1-12 %
Bazofili	$0-200/\mu\text{L}$	$0-0,2 \times 10^9/\text{L}$	0.3 - 1.4 %

Referentni intervali vrednosti broja ćelija u krvi moraju uzeti u obzir i varijabilnosti vezane za starost, pol, fiziološko stanje, istorijat ranijih analiza, način držanja životinja, temperaturu u objektima u kojima se životinje drže, stepen hidriranosti organizma, prisustvo nekih patogena kao što je goveđi virus leukemije (engl. *bovine leukemia virus* - BLV) ili parazita. Utvrđeno je da se normalan broj neutrofilnih granulocita goveda značajno povećao dok su se referentne vrednosti broja limfocita smanjile u periodu od nekoliko decenija (George i sar., 2008). U stručnoj i naučnoj literaturi se može naći veliki broj različitih referentnih vrednosti za goveda koje otkrivaju značajne intervalne različitosti. Najčešće se pominju razlike u vrednostima u odnosu na rasu goveda. Tako tovnja goveda imaju veći broj eritrocita (engl. *red blood count* - RBC) nego mlečne rase goveda. Krave u laktaciji imaju konstantno više vrednosti leukocita (engl. *white blood count* - WBC), RBC i proteina plazme nego što je to slučaj sa zasušenim kravama (Jain, 1986). Neki autori koriste referentne vrednosti za bikove, volove, zasušene krave i junad i prema ovim autorima se laktacija ne smatra normalnim fiziološkim stanjem. Starost goveda rezultira u znatnim razlikama u broju leukocita krvi. U prvim nedeljama života, neutrofilni granulociti su dominantni leukociti krvi teladi. Nakon druge nedelje taj primat preuzimaju limfociti. Goveda imaju najniži odnos neutrofilnih granulocita prema limfocitima i on kod odraslih goveda iznosi 0,5. (Brun-Hansen i sar., 2006; Mohri i sar., 2007). U stresnim situacijama, odnos neutrofilnih granulocita prema limfocitima može biti i veći od 1. Sa starošću goveda, opada broj i neutrofilnih granulocita i limfocita, ali limfociti i dalje ostaju dominantni leukociti krvi i odnos ovih ćelija se ne menja. Graviditet dovodi samo do malih promena u RBC i WBC. Kod krava pri teljenju, endogeni kortikosteroidi, uzbuđenje i stres rezultiraju neutrofilijom i limfopenijom (Naessens i Hobkins, 1996). Nakon porođaja, leukogram krava karakterišu neutrofilija, limfopenija, eozinopenija i monocitoza. Pojedina istraživanja pokazuju i promene u proporciji različitih populacija limfocita u vreme teljenja. Ove promene su delimično rezultat nutritivnih, ali i ostalih zdravstvenih parametara mada primarni uticaj na ovu pojavu svakako imaju graviditet i laktacija. Smanjeni broj neutrofilnih granulocita i limfocita kod tek oteljenih krava doprinosi imunosupresiji zbog čega su krave u ovom periodu podložne infektivnim oboljenjima (Kehrli i sar., 1989).

Najznačajnija razlika u leukogramu preživara i ostalih domaćih životinja postoji u ranom akutnom inflamatornom odgovoru. U prvih 24-48 časova, od početka akutne zapaljenjske reakcije, kod goveda dolazi do drastične neutropenije kao posledice migracije

neutrofilnih granulocita iz krvi u tkiva i njihove spore mobilizacije iz kostne srži (Lumsden i sar., 1974). Stres indukovano kortikosteroidima u toku inflamacije, doprinosi leukopeniji i smanjenju broja limfocita. Neutrofilija koju indukuju kortikosteroidi nije velika kod goveda kao što je to slučaj sa psima, mačkama ili konjima (Stockham i Scott, 2008). Smanjenje broja neutrofilnih granulocita rezultira smanjenim odnosom neutrofilnih granulocita prema limfocitima. Neutrofilija goveda koja se javlja nakon početnog stadijuma neutropenije je česta kod blagih i srednje teških inflamatornih procesa i redovno prati ozbiljna zapaljenja usled povećane produkcije neutrofilnih granulocita u kosnoj srži. U slučajevima hroničnih infekcija javlja se ili neutrofilnija ili broj neutrofilnih granulocita ostaje nepromenjen.

Inflamatorna neutrofilija se često može zapaziti kod krava sa mastitisom (Aroch i sar., 1997; Lehtolainen i sar., 2003), endokarditisom (Power i Rebhun, 1983) ili hepatitisom (Dore i sar., 2007). Goveda, ali i koze i ovce, imaju blažu leukocitozu pri akutnim inflamatornim procesima (Valli, 2007). Broj leukocita od 20-30 x 10³/μL krvi se smatra ekstremnom leukocitozom (Jain, 1993).

Neutropenija goveda obično prati perakutne i akutne infekcije kao što su: sepsa izazvana Gram - bakterijama (Santos i sar., 2002), mastitis, peritonitis, metritis, pneumonija i gastroenteritis. Neutropenija obično prestaje nakon što dođe do otpuštanja zrelih i nezrelih neutrofilnih granulocita iz kostne srži, obično za 48 časova. Neutropenija koja traje 3-4 dana je obično indikator supresije granulopoeze ili nemogućnosti generisanja dovoljnog broja neutrofilnih granulocita usled njihovog izuzetnog trošenja u procesu inflamacije (Jain, 1993). Neke virusne infekcije, kao što su virus goveđe virusne dijareje (BVDV) ili virus bolesti plavog jezika (engl. *bluetongue virus*) dovode do neutropenije. Neutropenija je kod virusnih infekcija obično prolaznog karaktera.

Eozinofilni granulociti su ćelije ključne za imunski odgovor pri parazitskim infekcijama i alergijskim reakcijama. Eozinofilija se kod goveda najčešće javlja kao posledica endoparazitskih infekcija (Conboy i Stromberg, 1991). Ona se ne mora uvek zapaziti u krvi, iako postoji snažan eozinofilni odgovor u tkivima. Ektoparaziti često izazivaju eozinofiliju, iako su Brown i sar. (1984) kod infestacije goveda krpeljima dokazali da ona ne mora biti uvek prisutna. Kod goveda je eozinopenija često posledica stresa, ali i nekih drugih uzroka kao što su nekroza kostne srži, supresija kostne srži ili fibroza.

Ekstremna eozinopenija je uočena kod infekcije goveda sa *Theileria parva* i *Theileria annulata* (Omer i sar., 2002).

Bazofilni granulociti se u krvi ponašaju slično eozinofilnim granulocitima i njihov broj se povećava obično u slučajevima parazitskih infekcija i u reakcijama prosetljivosti. Međutim, povećan broj bazofilnih granulocita se veoma retko detektuje kod goveda.

Limfocitoza nije česta pojava kod preživara, mada se može detektovati u slučajevima hroničnih virusnih infekcija ili hronične tripanozomijaze. Virus goveđe leukemije (BLV) dovodi do perzistentne limfocitoze kod trećine inficiranih goveda (Gillet i sar., 2007; Juliarena i sar., 2007) dok se kod 3-4% inficiranih goveda razvija leukemija. Najčešći uzrok limfopenije goveda je uzrokovan kortikosteroidima i predstavlja reakciju na stres. Osim toga, limfopenija se može javiti u akutnoj fazi virusnih infekcija, infekcijama bakterijama iz rodova *Ehrlichia* ili *Mycoplasma* (Brun-Hansen i sar., 1998; Kauf i sar., 2007) ali i pri drugim bakterijskim infekcijama, pogotovo u slučajevima sepse.

Monocitoza goveda je veoma retko posledica stresa i češće je posledica inflamatornih reakcija (Weiss i Perman, 1992), mada nije konstantna pojava i rede se detektuje. Monocitopenija je kod preživara najčešće povezana sa endotoksemijom, perakutnim i akutnim zapaljenjskim reakcijama.

2.3. Mastitisi krava – definicije, podela, dijagnostika i ekonomski aspekti

Zapaljenje (*inflammatio*) predstavlja odgovor živog tkiva na endogene i egzogene štetne faktore. Ovaj vitalni zaštitni mehanizam, kojim organizam pokušava da se oslobodi šetnog agensa ili da lokalizuje oštećenje, obuhvata niz promena koje se odigravaju u krvnim sudovima, krvi i međućelijskom matriksu. Oblik, težina i tok zapaljenjskog procesa, zavise od vrste i intenziteta šetnog agensa, vrste tkiva i opšteg stanja organizma. (<http://www.vet.bg.ac.rs/~patofiziologija/pdf/inflamacija.pdf>).

Jedan od najozbiljnijih i najupornijih inflamatornih procesa kod mlečnih krava je zapaljenje vimena - mastitis.

2.3.1. Morfologija mlečne žlezde

Vime krave je podeljeno na dve polovine - levu i desnu, a svaka se sastoji iz dve mlečne žlezde, jedne kranijalne i jedne kaudalne, sa po jednom sisom. Podela vimena na četvrti je spolja slabo uočljiva. Funkcionalno, svaka polovina vimena krave može da se podeli na prednju i zadnju četvrt, pri čemu svaka četvrt samostalno i nezavisno funkcioniše. Može se govoriti o dvema prednjim i dvema zadnjim četvrtima, pri čemu su veoma često zadnje četvrti bolje razvijene od prednjih. Prednje sise su duže od zadnjih i njihova dužina iznosi 7-9 cm, a zadnjih 5-7 cm.

Mlečna žlezda (*glandula lactifera*, *mamma*, *uber*, *mastos*) je složena tubulo-alveolarna kožna žlezda i pripada redu žlezda sa apokrinim tipom sekrecije. Karakteristična je za klasu sisara i njena primarna uloga je sinteza mleka za ishranu novorođenčadi (slika 28).

Mamarni kompleks se sastoji iz žlezdanog tela - *corpus mammae* i sise - *papilla mammae*, a u oba dela se nalazi zajednički sistem kanala. Kako mamarni kompleksi međusobno ne komuniciraju, zapaljenski proces na jednom kompleksu ne mora da se prenese na drugi.

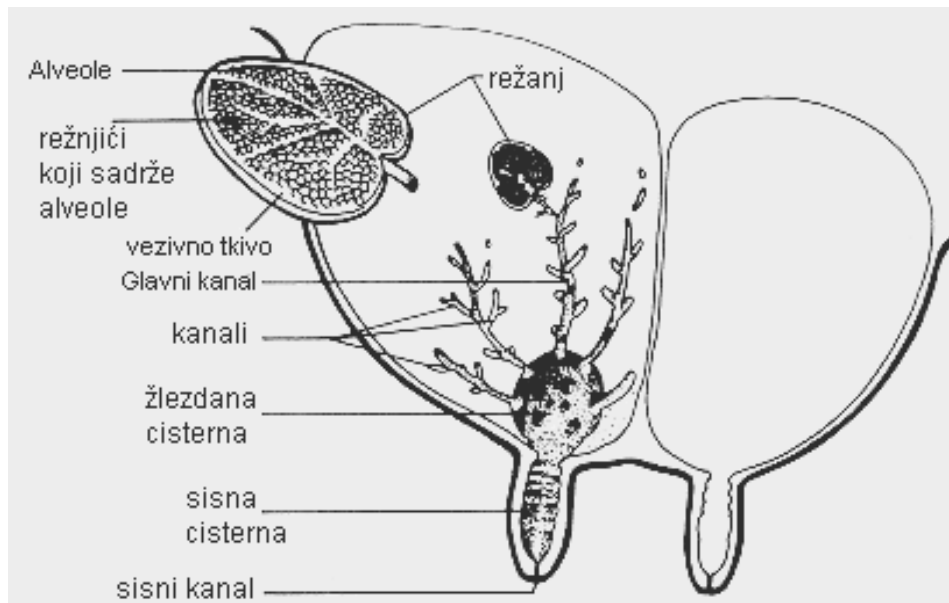
Žlezdano telo - *corpus mammae*, se sastoji od žlezdanog epitela i intersticijalnog vezivnog tkiva sa nervima, krvnim i limfnim sudovima (Magaš, 2012). Žlezdani epitel – *glandula mammaria*, je organizovan u obliku režnjeva – *lobusa*, koji su građeni od nekoliko režnjića – *lobulusa*, odvojenih vezivnim tkivom. Cisterna žlezde – *sinus lactiferus*, predstavlja nastavak žlezdane cisterne. U svaku cisternu se uliva 8-12 kanala, koji dovode mleko iz žlezdanog tkiva, a funkcija cisterne je deponovanje mleka.

Kod nekih životinja je intersticijum jače, a kod nekih slabije razvijen, što zavisi od rase, konstitucije, ishrane i starosti životinje i kod starijih je uvek jače razvijen. Kod mesnatog vimena, intersticijum je jače razvijen u odnosu na parenhim, pa sekrecija mleka nije obilna.

Između intersticijuma je parenhim vimena. Najjače je razvijen u odnosu na druge strukturne delove vimena u punom stadijumu laktacije i sastoji se iz sitnih razgranatih kanalića, koji se šire u sekretorne meškove - alveole, koje se sastoje od jednog sloja epitelnih ćelija, koji leže na bazalnoj membrani.

Između epitelnih ćelija i bazalne membrane su mioepitelne ćelije (specijalizovane mišićne ćelije), koje se pod dejstvom oksitocina, koji se sintetiše u neurosekretivnim ćelijama hipotalamusa, kontrahuju i posledično dovode do pojačanog lučenja mleka u alveole. Alveole imaju odvodne kanaliće - *ductuli lactiferi*, koji su položeni intralobularno. Međusobno se udružuju i formiraju veće kanale – *ductus lactiferi*, koji su položeni interlobularno. *Ductus lactiferus* uvire u mlečnu cisternu – *sinus lactiferus*. Iz cisterne izlazi jedan ili više kanala, koji vode kroz sisu (sisni kanal – *ductus papillaris*). On se završava malim otvorom na vrhu sise – *ostium papillare*, kroz koji tokom muže ili sisanja, mleko dospeva u spoljašnju sredinu.

Sise vimena preživara – *papillae mammae*, su valjkaste i slabo nagnutne u ventrokranijalnom pravcu. Sisni kanal je glavna barijera infekcijama, koji se zatvara pomoću *m. Sphincter papillae* koji obavija kanal i ne dozvoljava da mleko slobodno curi u spoljašnju sredinu. Unutar sisnog kanala se nalazi mišićni sloj - Firstenbergova rozeta, koji može da se izvrne u kanal kada se on otvori u momentu prepunjenosti vimena mlekom. Ovo može da bude glavni razlog prodora leukocita iz sisnog kanala u cisternu (Božičković, 2014).



Slika 2.28. Građa mlečne žlezde (Magaš, 2012; izvor: http://nongae.gsnu.ac.kr/~cspark/teaching/images/fig_10_1.gif)

2.3.2. Definicije, etiološka i klinička podela mastitisa

2.3.2.1. Pojam i definicije mastitisa

Mastitis predstavlja upalno oboljenje mlečne žlezde i mlečnih kanala i od velikog je ekonomskog značaja kod mlečnih krava, s obzirom da može dovesti do promene kvaliteta i smanjenog obima proizvodnje mleka. Krave su najosetljivije na mastitis u periodu teljenja i fazi rane laktacije. Mastitis se karakteriše patološkim promenama u žlezdanom tkivu vimena i fizičkim, hemijskim i bakteriološkim promenama u mleku (Sharma, 2007).

Prema Bojanić-Rašović (2012), fizičke i hemijske promene, koje nastaju u mleku krava obolelih od mastitisa, mogu biti sledeće: smanjenje sadržaja laktoze, kazeina, mlečne masti, kalijuma, kalcijuma i fosfora; povećanje sadržaja proteina poreklom iz krvi, serum albumina, serum globulina (imunoglobulina), natrijuma, hlora, bikarbonata i pH vrednosti.

U našoj zemlji, mastitis predstavlja veliki problem u govedarstvu. Razlog ovome su, prvenstveno, loši higijenski uslovi, ali i to što se higijeni vimena i drugim oblicima prevencije ne poklanja dovoljna pažnja.

Promene kvaliteta mleka zavise od inteziteta poremećaja u sekreciji u odnosu na zdravo mleko. Pod pojmom poremećaja sekrecije, podrazumevaju se različita oštećenja mlečne žlezde, koja nisu samo mikrobiološkog porekla.

Prodor bakterija i njihov rast u mlečnoj žlezdi su, ipak, glavni uzrok nastajanja mastitisa kod krava. Nakon prodora bakterija, dolazi do niza kaskadnih reakcija.

Prvo, iz krvi do mesta infekcije dolaze neutrofilni granulociti koji su prva linija odbrane organizma od prodora bakterija. Glavna funkcija neutrofilnih granulocita je u fagocitovanju i uništavanju bakterija. Nakon fagocitovanja bakterija nastaje niz hemijskih reakcija koje rezultiraju njihovim uništavanjem, pri čemu se oslobađaju citotoksični slobodni radikali i proinflamatorni citokini. Zatim, ovi reaktivni molekuli dovode do inhibicije lipidnih peroksidaza, bakterijskih toksina i do inhibicije ćelijskog metabolizma fagocitovane bakterije. Životni vek neutrofilnih granulocita je kratak, i za to vreme svaki neutrofilni granulocit može da fagocituje 5-20 bakterija.

Delovanje proinflamatornih supstanci nastalih oslobađanjem visoko reaktivnih molekula se ublažava antioksidansima, koji predstavljaju intracelularni mehanizam odbrane

od oksidacije. Superoksid dismutaza, glutation peroksidaza i katalaza u mlečnoj ćeliji, uklanjaju superokside i perokside pre nego što oni stupe u reakciju sa metalnim katalizatorima u ćelijama i stvore razorna toksična jedinjenja. Ovaj intracelularni mehanizam odbrane dovodi da smanjenja stepena oštećenja mlečne ćelije tokom akutne faze inflamacije.

Inflamatorna reakcija mlečne žlezde je posledica intramamarne infekcije, gde dolazi do oštećenja žlezdanih sekretornih epitelnih ćelija, a poslednično dolazi do pada sekrecije. Endogene ćelije mleka potiču iz krvi i tkiva vimena i javljaju se u mleku zdravog vimena u promenljivoj količini. Kod upalnih stanja vimena, broj endogenih ćelija se može povećati u manjoj ili većoj meri, u zavisnosti od stepena inflamacije. Ovde se, pre svega, radi o ćelijskoj nespecifičnoj odbrambenoj reakciji na bazi intenzivnog dotoka neutrofilnih granulocita i makrofaga u inficirano vime i mleko u njemu.

Povećani zahtevi za kvalitetom mleka, takođe, uslovljavaju povećane zahteve ranog otkrivanja zapaljenja mlečne žlezde, jer ono utiče na sastav mleka i povećava električnu provodljivost i telesnu temperaturu, a proizvodnja mleka je samim tim manja. Poznato je, takođe, da se taj problem, u većini slučajeva, odnosi na hronične kataralne mastitise. To su takvi poremećaji gde je narušen fizičko-hemijski sastav mleka, pogotovo u pogledu ćelijskih elemenata (Đoković i sar., 2014).

Zapaljenja mlečne žlezde su, u najvećem broju slučajeva, posledica infekcije bakterijama, ali se smatra da njihovo prisustvo kod upale nije jedini i odlučujući faktor. Niz spoljašnjih i unutrašnjih faktora u organizmu, odnosno u vimenu, smanjuje otpornost tkiva i stvara uslove da se razvije upala mlečne žlezde kod krava, kao što su: genetika (nasledni faktor), ishrana, klimatski faktori i godišnje doba, prehlade, povrede, greške u izmuzavanju (nedovoljna priprema životinje, nepotpuna muža, muža na slepo, neredovna muža, nepravilan rad pulzatora, promene pritiska u sistemu, istrošeni pribor i dr.), oblik vimena i sisa, stadijum laktacije, opšte bolesti (posebno puerperalne), bolesti kože i visoka mlečnost.

Pri razmatranju etiologije mastitisa postoje podeljena mišljenja o primarnom uzroku njihovog nastanka. Ukoliko se svi poznati faktori pojave mastitisa svrstaju u dve velike grupe, može se konstatovati da, sa jedne strane, postoji predispozicija i sve ostalo što pogoduje razvoju upale, a s druge strane - infekcija. Shodno tome, razumljivo je da u lošim uslovima držanja, uz kontaminiranu sredinu mikroorganizmi lako naseljavaju površinu

vimena i sise. U takvim uslovima samo je pitanje vremena kada će patogeni sa inficirane površine ući i u unutrašnjost vimena (Jakovac i Mašek, 1971).

2.3.2.2. Etiološka i klinička podela mastitisa

Odgovor mlečne žlezde na prisustvo mikroorganizama može da bude izražen u kliničkoj formi (klinički mastitis), sa raširenošću od 1-3%, i u supkliničkoj formi (supklinički mastitis), sa raširenošću većom od 30% (Stojanović i sar., 2001).

Pojava mastitisa, bez dokaza o uzročnicima, ukazuje na poremećaj sekrecije bez infekcija izazvanih patogenim mikroorganizmima u 10-40% slučajeva. Utvrđeno je i da u ranoj laktaciji postoji veliki broj ovakvih mastitisa, a on je u vezi sa visokom prevalencijom i incidencijom infekcije krava sa koliformnim mikroorganizmima, koji vrše produkciju toksina, pa su izuzetno značajna ispitivanja uticaja lipopolisaharida, koji predstavljaju toksine. U ovim slučajevima se mora voditi računa da oštećenje mlečne žlezde može biti posledica prebolelih mastitisa i da je antibiotski tretman vimena doveo do negativnog bakteriološkog nalaza. Kliničke i supkliničke upale vimena, bez nalaza uzročnika, izazvane su kompleksnim nizom faktora, koji direktno ili indirektno izazivaju oštećenja mlečne žlezde.

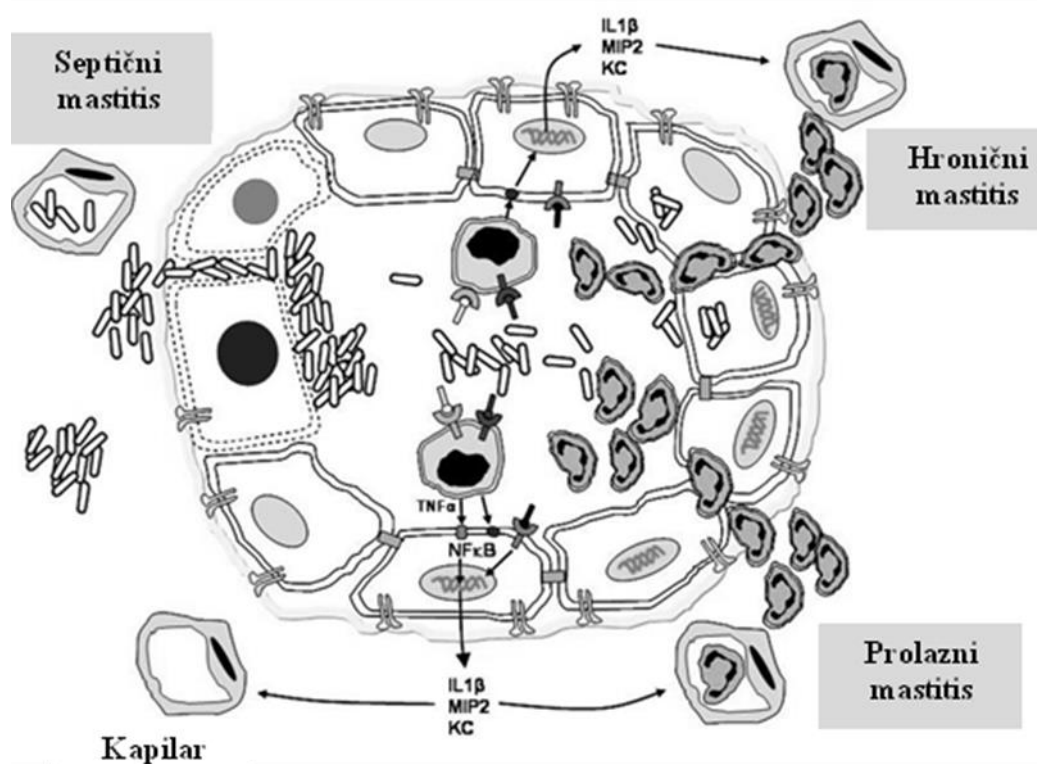
Mikroskopski pregled tkiva mlečne žlezde u fazi upale potvrđuje prisustvo atrofičnih resica i širokih interalveolarnih septi. Sloj epitela je pri tome tanji, a u interalveolarnom tkivu se uočava limfo-histiocitna infiltracija različitog stepena. Kod intenzivnije ćelijske proliferacije, veći deo alveola je skoro potpuno zatvoren ili uništen.

U okolini izmenjenih delova mlečne žlezde interlobularno vezivno tkivo se širi. U papilama su utvrđene metaplazije epitela cisterne. Usled poremećaja lučenja mleka na tkivu vimena mogu se stvoriti ciste ispunjene sekretom, veličine zrna prosa pa do veličine lešnika.

Neretko se javljaju i proširenja mlečne cisterne, a od velikog značaja su suženja i začepljenja mlečnih kanala. Ona su u *ductus papillaris*-u pretežno uslovljena hiperkeratozom pločastog epitela. Nasuprot tome, nastaju suženja lumena i u cisterni i mlečnim kanalčićima, uglavnom kao posledica upalnog procesa.

Kod supkliničkih i hroničnih mastitisa, često se lumen mlečnih kanala delimično ili potpuno začepljuje metaplastičnim pločastim epitelom. Osim toga, može doći do subepitelne upalne proliferacije, pri čemu nastaju čvorasti ili prugasti nabori (Đoković i sar., 2014).

Shematski prilaz patogeneze hroničnog, prolaznog i septičnog mastitisa dat je na slici 2.29.



Slika 2.29. Patogeneza hroničnog, prolaznog i septičnog mastitisa (Grinberg i sar., 2008)

Dijagnostika kliničkih mastitisa ne predstavlja problem, budući da u tim slučajevima dolazi do otoka, temperiranosti, bola i induracije u mlečnoj žlezdi, kao i promena u mleku. Mleko se može promeniti u konzistenciji i boji, kada se primećuje prisustvo krpica, tragova gnoja, krvi ili boja mleka odgovara boji piva. Dijagnoza se postavlja palpacijom i pregledom prvih mlazeva mleka (Bramley, 1991).

U slučajevima supkliničkih mastitisa, ne zapažaju se klinički vidljive promene na mlečnoj žlezdi, već samo u mleku. Zbog toga se za otkrivanje supkliničkih mastitisa koriste metode zasnovane na merenju promena u mleku, a to su najčešće metode koje određuju broj leukocita u njemu (Klastrup, 1985; Sandholm i Matilla, 1986; Sender, 1986). Povećan broj leukocita je znak reakcije tkiva, pa su i promene u mleku njihov rezultat (Shepers i sar., 1997;

Katić i Stojanović, 1998). Kliničke forme mastitisa se lako zapažaju, dok su supklinički mastitisi, koji višestruko negativno deluju, praktično nevidljivi.

Prema istraživanjima Erskine i sar. (1993), supklinički mastitis kod krava ne izaziva nikakve vidljive simptome ili promene u mleku ili vimenu, ali su smanjeni kvalitet i kvantitet mleka, zbog funkcionalnog poremećaja u parenhimu vimena. Osim toga, ovi autori smatraju da krave sa simptomima supkliničkog mastitisa predstavljaju i rezervoar infektivnih agenasa mastitisa u zapatu, kao i to da stepen izlečenja, primenom intramamarnе antibiotске terapije krava u laktaciji uglavnom zavisi od vrste i virulentnosti patogena. Pri tome je mikroorganizam najotporniji na terapiju bakterija *Staphylococcus aureus*. Ostali mikroorganizmi, kao što su *Corynebacterium bovis*, koagulaza negativne stafilokoke, *Pseudomonas aeruginosa* i Gram - bakterije, mogu takođe izazvati supklinički mastitis (Musal i sar., 2007).

Dahlberg i sar. (1936) navode da je u hemijskom sastavu mleka zaraženih krava došlo samo do neznatnih promena u odnosu na mleko neinficiranih krava sve dok je mleko bilo normalno u izgledu. Međutim, kada je infekcija postala akutna, sastav mleka se znatno pogoršao. Među uočenim promenama u mleku, ovi autori navode i smanjenje sadržaja laktoze, specifične težine, kao i povećanje koncentracije hlorida i albumina.

Kako četvrti vimena međusobno ne mogu da komuniciraju, uzročnici pri spontanom pojavljivanju mastitisa mogu da dospeju u mlečnu žlezdu na nekoliko načina, i to: putem krvotoka iz nekog žarišta u organizmu (hematogeno, limfogeno), kroz sisni otvor i sisni kanal (galaktogeno) i preko povreda na koži sisa i vimena (infekcija rane).

Mastitisi se po toku mogu podeliti na perakutne, akutne, subakutne i hronične. Na osnovu kliničko-patološke slike toka oboljenja, mastitisi se dele na kataralne (zapaljenjem su zahvaćeni sisni kanal i cisterna), intersticijalne (zahvaćeno je vezivno tkivo mlečne žlezde) i parenhimatozne (mastitisom je zahvaćen žlezdani deo vimena).

Mastitisi se mogu još podeliti i u zavisnosti od mikroorganizama, koji izazivaju zapaljenski proces i koji se nalaze u mleku, odnosno, na osnovu izazivača mastitisa - etiologije.

Na osnovu etiologije, mastitisi se mogu podeliti na:

1. *Specifične*:

a) Specifično patogeni, izazvani sledećim mikroorganizmima: *Staphylococcus aureus*, *albus*, *citreus*; *Streptococcus agalactiae*, *dysgalactiae*, *uberis*; koliformni mikroorganizmi - *E. coli*, *Proteus sp.*, *Klebsiella sp.*; *Arcanobacter pyogenes*; *Pseudomonas aeruginosa*;

b) Uslovno saprofitski, izazvani sledećim mikroorganizmima: *Corynebacterium bovis*; nehemolitične mikrokoke.

2. *Nespecifične*: aktinomikoza, botriomikoza, tuberkuloza; izazvani sledećim patogenima: *Listeria sp.*, *Leptospira sp.*, *Pneumococcus sp.*, *Brucella sp.*, *Candida albicans*, *Criptococcus neoformans*, mikoplazme, alge - *Prothoteca sp.*, rikecije.

Postoji i nekoliko sledećih podela uzročnika mastitisa (Pankey, 1989; Radostits i sar., 1994; Stojanović i sar., 2001):

1. *Patogeni mikroorganizmi*: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Arcanobacter pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycoplasma*; *Mikroorganizmi okruženja*: *E. coli*, *Proteus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*; *Normalna mikroflora izvodnog mlečnog kanala*: *Staphylococcus hycus*, *Staphylococcus epidermidis*, Koagulaza negativne stafilokoke (CNS), *Corynebacterium bovis*;

2. *Uzročnici velike patogenosti*: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma*, *E. coli* - koliformni mikroorganizmi;

3. *Uzročnici male patogenosti*: *Corynebacterium bovis*, Koagulaza negativne stafilokoke (CNS).

Klinička podela mastitisa je zasnovana na toku bolesti, osobinama sekreta, kao i vrsti simptoma koji prevladavaju u kliničkoj slici.

Obzirom na veliki značaj mastitisa, kako sa gledišta zdravlja životinja, tako i sa ekonomskog aspekta govedarske proizvodnje, Zakon o veterinarstvu (Sl. glasnik RS 91/05, 30/10, 93/12) je u delu zaraznih bolesti životinja određenih Zoosanitarnim kodeksom (OIE) uvrstio i oboljenje, koje je označeno kao „Enzootski mastitis goveda“. Slično tome, veterinarska služba Republike Srbije se, Programom mera zdravstvene zaštite životinja u

Republici Srbiji (Sl. glasnik RS 21/12), obavezuje da prati, otkriva, suzbija i kontroliše infektivno zapaljenje mlečne žlezde, izazvano stafilokokom ili streptokokom (Magaš, 2012).

Akutni kataralni mastitisi (*mastitis catarrhalis acuta*) su ređe praćeni poremećajem opšteg stanja. Sekrecija mleka je smanjena, a mleko može da sadrži primese gnoja. Epitel sluzokože cisterne je zadebljao, delimično deskvamisan i infiltrovan seroznom tečnošću, koja je bogata belančevinama, limfocitima i histiocitima. Sise su bolne i životinja se opire muži. Najčešći prouzrokovaci ovog mastitisa su streptokoke (*Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* i *Streptococcus uberis*), ređe drugi mikroorganizmi. Javlja se neposredno posle teljenja, u periodu najveće mlečnosti. Mleko je obično promenjeno u prvim i poslednjim mlazevima, jer su streptokoke "stanovnici" izvodnih kanala, u kojima je i glavno mesto njihovog patološkog delovanja (Miljković, 1977). Mleko može da sadrži deskvamisan epitel izvodnih kanala u obliku krpica, kao i primese krvi. Ovi mikroorganizmi tokom vremena dovode do prestanka stvaranja mleka, odnosno do agalaksije, što je poznato kao zarazno presušenje vimena ili žuti galt. Tako, istraživanja pojedinih autora (Keefe, 1977) ukazuju da *Str. agalactiae* može biti prisutan na farmama u visokom procentu, čak i do 44,7%. Ovaj autor ukazuje da je od 58,5% inficiranih krava, čak 69% izolata činio *Str. agalactiae*. Slično tome, Keskin i sar. (2007) navode da je *Streptococcus spp.* bio prisutan kod 12,3% mlečnih krava, CNS kod 10,9%, *S. uberis* kod 9%, a *S. aureus* kod 34,7% mlečnih krava. Akutne mastitise u mnogo blažoj formi izaziva *Str. dysgalactiae*, ali se sisanjem teleta ovi mastitisi veoma lako šire sa jedne u drugu četvrt. Ovaj mastitis na farmama može biti prisutan u supkliničkom obliku i može da čini 7 do 75% ukupnih mastitisa (Schalm i sar., 1971). Rezervoar ovog streptokoknog soja može biti koža krave, gde mikroorganizam može da preživi od 1 do 26 dana, a njegovo prisustvo je utvrđeno u ranama na sisama (61-81%). On može da preživi niske i visoke temperature i po nekoliko nedelja na raznim štalskim alatnama i mašinama (Schalm i sar., 1971).

Hronični kataralni mastitisi (*mastitis catarrhalis chronica*) prolazi najčešće nezapaženo i veoma često prouzrokuje zadebljanje tkiva mlečne žlezde. Makroskopski, sekret uglavnom nije promenjen, ali mleko ima povećan broj somatskih ćelija i specifičan slani ukus. Sekrecija mleka se smanjuje, a može i sasvim da prestane. Kod hroničnih kataralnih mastitisa veoma često se stvaraju intralobularne ciste, koje se palpiraju kao čvrsti, ponekad pokretni čvorići, odmah ispod kože. Zbog dugog trajanja procesa, kod ovih mastitisa se mogu formirati i pseudokonkrementi (*corpora amylacea*) u mleku. Najčešće se hronični kataralni

mastitisi ne mogu klinički uočiti, pa prolaze kao latentne ili supkliničke infekcije. Izazivači hroničnog mastitisa su pretežno mikroorganizmi iz roda *Streptococcus*, ređe *Staphylococcus*, *Micrococcus* i *Pseudomonas* (Magaš, 2012).

Stafilokoke mogu u akutnoj formi bolesti da dovedu do teških, malignih mastitisa, u vidu granulomatoznih promena. Koža je cijanotična, zažarena, a u parenhimu se javljaju nekrotična žarišta. Krvni sudovi, u akutnoj formi stafilokoknog mastitisa, često tromboziraju. Javljaju se visoka temperatura (41-42 °C), ubrzan puls, gubitak apetita i prestanak preživljanja, a zahvaćena četvrt je tvrda, bolna i zacrvenjena. Tokom 24h može da dođe do gangrenoznog zapaljenja vimena, koje postaje modro i tamno. Ovaj stadijum bolesti često prati toksemija. Mleko je promenjene boje i veoma često sadrži krvne ugruške. Hronične forme stafilokoknog mastitisa uglavnom često prolaze i kao supklinički oblici oboljenja mlečne žlezde. Zahvaćene četvrti obično prati vezivno-tkivna induracija žlezdanih acinusa, kao i atrofija četvrti sa polipoznim zadebljanjima sluzokože cisterne. Mleko uglavnom nije promenjeno, a produkcija je smanjena (Magaš, 2012). Ispitivanja Middleton-a i sar. (2008) ukazuju da je *S. aureus* prisutan kod 7% krava na farmama, a koagulaza negativne stafilokoke (CNS) čak kod 58% krava. Prema drugima utorima, klinički mastitisi izazvani bakterijom *S. aureus* su na nekim farmama zastupljeni i do 18,7% (Keskin i sar., 2007). Leitner i sar. (2011) navode da CNS mogu biti prisutne u vimenu mlečnih krava i u preko 25% slučajeva, a *S. aureus* od 3 do 7% od ukupnih mastitisa na jednoj farmi. Proučavajući odnos između organske proizvodnje mleka i klasičnog sistema držanja mlečnih krava, Roesch i sar. (2007) nisu utvrdili statističku značajnost u procentu pojavljivanja najčešćih uzročnika mastitisa. U skladu sa tim, isti autori navode da supklinički mastitisi, izazvani bakterijom *S. aureus*, na farmama mogu biti prisutni od 20 do 28%, zatim, koagulaza negativnim stafilokokama od 18 do 28%, bakterijom *E. coli* do 1%, *C. bovis* oko 5%, dok bakterija *S. agalactiae* nije izolovana. Istraživanja Vakanjac i sar. (2008) opisuju supkliničke mastitise izazvane bakterijom *S. aureus* i prisutne u mleku od 19 do 33,3% krava, a kliničke mastitise izazvane istim mikroorganizmom kod 14,2% grla.

Akutni kataralni mastitis može izazvati i bakterija *Pseudomonas aeruginosa*, sa pojavom krpica gnoja u mleku i induracijom četvrti. Ponekad, ova bakterija može izazvati i teške akutne mastitise, koji ugrožavaju život životinje, zbog pojave hiperemije i nekroze tkiva. Limfni čvorovi u tom slučaju su uvek povećani i bolni.

Piogeni mastitisi (*mastitis apostematosa*) najčešće su izazvani bakterijom *Arcanobacter pyogenes*, ređe drugim mikroorganizmima, kao što je *Spherophorus necrophorus*. Smatra se da infekcija nastaje nakon povreda sisa ili vimena, koje su nastale kao posledica ujeda insekata na paši. Predisponirajući faktori za nastanak ovog mastitisa su povrede sisa i kože same mlečne žlezde, prouzrokovane hroničnim bakterijskim infekcijama, pašom u blizini močvare, kao i lošim vremenskim prilikama. Oboljenje se najčešće javlja leti, dok su životinje na paši i usled povećanog broja insekata. Na vimenu se uočavaju čvrste tvorevine, različite veličine i broja, koje se mogu lako palpirati. Limfni čvorovi su najčešće povećani, ali opšte stanje životinje ne mora biti promenjeno. Moguće je spontano otvaranje apcesa iz koga se cedi gnojno-nekrotična masa. Zbog specifičnosti mikroorganizma, moguće su metastaze na jetri, bubrezima, tetivama i zglobovima.

Flegmonozni mastitis (*mastitis phlegmonosa*) se naziva i “koli” mastitis, budući da je njegov najčešći prouzrokovatelj bakterija *Escherichia coli*, a ređe drugi koliformni mikroorganizmi, kao što su *Proteus* ili *Klebsiella*. Predisponirajući faktori su porođaj, zadržana posteljica, neispravni i nečisti aparati za mužu i visoka mlečnost. Ovi uzročnici su normalni stanovnici okolne sredine, digestivnog trakta, kože i spadaju u ubikvitarne bakterije, a postaju patogeni kada se naruši odnos mikro i makroorganizma. Klinički koliformni mastitisi nastaju obično u laktaciji, a retko u zasušenju (Magaš, 2012).

Perakutni koliformni mastitis je teško oboljenje, koje se javlja naglo sa izraženom toksemijom, gubitkom apetita, depresijom, groznicom i povišenom telesnom temperaturom, od 40-42°C. Životinje najčešće leže, rad srca im je ubrzan i imaju indigestiju. Obolele četvrti su tople, bolne, jače ili slabije otečene, a menja se i izgled mleka, od vodenastog sekreta, do retke žućkaste tečnosti (boje piva) sa pahuljicama. Prema studijama Keskin-a i sar. (2007), ovaj mastitis je prisutan na farmama i do 3% od ukupnih mastitisa. Ponekad se kod ovog mastitisa mogu javiti pareze ili paralize zadnjeg dela tela. Tok perakutnog mastitisa je brz, tako da kod nekih životinja može da dođe i do smrtnog ishoda u toku 24-48 sati od pojave prvih simptoma. Akutni i hronični tok ovog mastitisa protiče sa mnogo blažim simptomima, jer je otok vimena manji, a telesna temperatura nije povećana. Mleko je promenjeno, kao i u perakutnom toku.

Granulomatozni mastitis (*mastitis granulomatoza*) je gljivične etiologije, koji se javlja veoma retko, i to obično posle dugotrajne terapije antibioticima ili kortikosteroidima.

Uzročnici su uglavnom iz roda *Candida* ili *Criptococcus*. Mastitisi se manifestuju uvećanjem četvrti vimena, koje postaju tvrde konzistencije, kao i pojavom sluzavog, sivo-belog, rastegljivog sekreta u mleku (Magaš, 2012).

2.3.3. Dijagnostika mastitisa i ekonomski aspekti

2.3.3.1. Simptomi i dijagnostika mastitisa

Patogeneza mastitisa počinje od povrede/oštećenja žlezdanog tkiva, nakon čega slede invazija, kolonizacija i infekcija. Infekcija rezultira daljim oštećenju tkiva sise, što bi trebalo sanirati u vrlo brzom roku (Naresh i sar., 2002). Shodno tome, rana dijagnoza i terapija mastitisa obezbeđuju brži oporavak, povratak na normalnu proizvodnju mleka i smanjeno oštećenje mlečne žlezde.

Uopšteni *simptomi mastitisa* su nezainteresovanost i tromost krava, gubitak apetita i edem vimena. Uvećano je celo vime (ili samo pojedine četvrti) koje je tvrdo i toplo, crvene ili sive boje. Mleko je promenjene (tamnije) boje, mirisa, ukusa i gustine (gušće je) uz pojavu gnoja ili krvi. Ipak se smatra da je mnogo opasniji supklinički oblik mastitisa (skrivena forma) kod koje nema jasno izraženih simptoma.

U okviru dijagnostike poremećene sekrecije vimena do danas su poznate brojne metode, koje se mogu podeliti na kliničke (stajske) i laboratorijske. Sve ili neke od pouzdanijih metoda, u dijagnostičkom smislu, zajedno imaju neku vrednost, ali to je naporna, složena i skupa aktivnost. Naročito, ukoliko se sprovodi samo da bi se nešto dokazalo, a izdvaja se iz celokupne zdravstvene zaštite vimena.

Budući da su uzročnici upala vimena u najvećem broju slučajeva infekcije (bakterije, gljivice), osnova svih pretraga bi trebala da se zasniva na bakteriološkoj kontroli mleka pojedinih četvrti. Pored poznatih metoda, kliničkog ili stajskog pregleda vimena, kao što su inspekcija, palpacija pre i posle muže, crna podloga, određivanje pH i konduktometrija i laboratorijske pretrage (broj ćelija, sediment, *Hotis* test, *White Side* test, *Branat* test i dr.) su našle praktičnu primenu, ne samo kao dopuna kliničkoj pretrazi vimena, nego i u mlekarskoj kontroli zbirnog uzorka sirovog mleka.

U mleku krava, u fiziološkim uslovima, stalno se nalaze različiti tipovi ćelija: neutrofilni granulociti (polimorfonuklearni granulociti, PMNL), limfociti, eozinofilni

granulociti, makrofagi i epitelne ćelije (Pillai i sar., 2001). Ovaj ćelijski sadržaj je poznat pod nazivom "somatske ćelije mleka" (SCC, engl. *milk somatic cells*). Broj ovih ćelija u mleku zdravih krava se kreće od $160-450 \times 10^3/\text{mL}$, a prema kriterijumima Međunarodne mlekarske federacije, granična vrednost broja ćelija u 1 mL mleka zdravih krava iznosi 500×10^1 (Schalm i sar., 1971). Prema Frerking-u (1961), broj somatskih ćelija na početku laktacije može da se kreće i do 2 500 000 ćelija u mL (Magaš, 2012). Isto tako, prema predlogu IDF-a (*International Dairy Federation*) iz 1971. godine, mastitis se definiše kao nalaz više od 5×10^5 somatskih ćelija u 1 mL ispitivanog mleka, uz izolaciju uzročnika (Hristov i sar., 2005).

Broj leukocita u mleku ispitivane četvrti definiše pojavu mastitisa, ali i u zbirnom uzorku mleka, kada upućuje na stopu inficiranosti zapata. Prema Brolund-u (1985), kada je broj somatskih ćelija manji od 2×10^5 u mL uzorkovanog mleka, u zapatu najverovatnije, nema supkliničkih mastitisa izazvanih najznačajnijim patogenima, kao što su *S. aureus*, *Streptococcus* spp. i koliformne bakterije. Isti autor navodi i da vrednosti preko 5×10^5 somatskih ćelija u 1 mL mleka ukazuju da je oko 16% životinja inficirano, u jednoj ili više četvrti. Nalaz 4×10^5 somatskih ćelija/mL ukazuje da je jedna trećina, a preko 7×10^5 da je najmanje dve trećine krava u zapatu inficirano (Eberhart i sar., 1982; Brolund, 1985; Hristov, 2002).

Pojedini autori ističu da broj somatskih ćelija govori i o gubicima nastalim kao posledica kliničkih i supkliničkih mastitisa. Mastitis se u zapatu ne registruje i nema gubitaka mleka ako je broj somatskih ćelija u zbirnom uzorku ispod $25 \times 10^4/\text{mL}$ ispitivanog mleka. Nalaz od $25-35 \times 10^4/\text{mL}$ ukazuje na „neznan broj” krava sa mastitisom i gubitke mleka manje od 4%, zatim, broj od $35-50 \times 10^4/\text{mL}$ ukazuje na problem sa većim brojem krava i gubitke oko 5%, dok $50-75 \times 10^4/\text{mL}$ ukazuje na loše stanje u zapatu i gubitke veće od 5%. Jasne promene tehnoloških svojstava mleka i gubici od preko 12% se mogu uočiti kada je broj somatskih ćelija u 1 ml mleka veći od 75×10^4 (Majić, 1995; Hristov i sar., 2005).

Normalna struktura somatskih ćelija mleka zavisi od tipa sekrecije i perioda laktacije (tabela 2.3).

Broj somatskih ćelija raste kako odmiče period laktacije i najveći je u kasnoj laktaciji, bez obzira da li je krava zaražena ili ne (Dohoo i Meek, 1982). Tokom ranog i kasnog perioda laktacije, procenat neutrofilnih granulocita ima tendencu povećavanja, dok se procenat limfocita smanjuje (McDonald i Anderson, 1981). Na porođaju je broj somatskih ćelija

obično veći od milion po mL i smanjuje se do 100 000 ćelija/mL u 7 do 10 dana nakon porođaja (Jensen i Eberhart, 1981) (tabela 2.4). Takođe je prisustvo velikog broja ćelija utvrđeno i u kolostrumu, najverovatnije usled prevelike deskvamacije epitelnih ćelija u maloj zapremini mleka u žlezdi, koja nastavlja svoje osnovne funkcije nakon perioda mirovanja (Schalm i sar., 1971).

Tabela 2.3. Struktura somatskih ćelija u različitim tipovima mlečne sekrecije (Sharma i sar., 2011)

Tip mlečne sekrecije	Somatske ćelije mleka (%)			
	PMNL	Makrofagi	Limfociti	Epitelne ćelije
Mleko	3	80	16	2
Kolostrum	62	35	4	0
Suva žlezdana sekrecija	3	89	7	1

PMNL - polimorfonuklearni granulociti.

Tabela 2.4. Prosečna brojnost somatskih ćelija u zavisnosti od dana laktacije i stanja infekcije (Harmon, 1994)

Laktacija (dani)	Broj somatskih ćelija - SCC (x 10 ³ /ml)			
	Sve krave	Stanje infekcije		
		Nema	Uzročnici male patogenosti	Uzročnici velike patogenosti
0-49	380	164	247	839
50-99	429	138	286	861
100-149	498	125	240	1,068
150-199	399	126	295	735
200-249	452	208	240	902
250-299	445	139	267	758
>300	634	165	374	1,031

Brojni autori navode da se broj somatskih ćelija povećava sa starošću životinje (Beckley i Johnson, 1966; Blackburn, 1966) (tabela 2.5). Smatra se da je ovo stanje, pre svega, posledica povećane prevalencije infekcija kod starijih krava (Reichmuth, 1975).

Tabela 2.5. Prosečan broj somatskih ćelija u zavisnosti od starosti krava i stanja infekcije (Harmon, 1994)

Laktacija (godine)	Broj somatskih ćelija - SCC (x 10 ³ /ml)			
	Sve krave	Stanje infekcije		
		Nema	Uzročnici male patogenosti	Uzročnici velike patogenosti
2	232	126	190	614
3	314	149	218	661
4	390	148	233	753
5	564	180	308	977
6	544	194	322	880
7	654	251	320	986
>7	868	113	519	1,207

Promene u mleku pogođenih četvrti se odnose na promenu boje, prisustvo ugrušaka i naročito, povećanog broja leukocita, što se smatra najobjektivnijim parametrom u dijagnostici mastitisa, definišući ga kao oboljenje sa povećanim brojem leukocita u svežem mleku poreklom iz obolele četvrti. Ovo povećanje se javlja kao reakcija tkiva na insult, sa prethodnim promenama u mleku, koje su posledica oštećenja tkiva (Radostits i sar., 1994; Hristov i sar., 1997).

Može se konstatovati da se, od svega navedenog, do pouzdanog i vrednog rezultata može doći jedino ukoliko se razrade metode celokupne kontrole i zdravstvene zaštite vimena. Osnovica te kontrole leži u individualnoj kontroli zdravlja vimena svake krave (Jakovac i Mašek, 1971). Određivanje SCC se, u istraživačkim i praktičnim uslovima, može izvoditi direktnim brojanjem aparatima tipa Fossomatic ili, češće, indirektnim metodama. Dosadašnji način praćenja i kontrole kliničih i supkliničkih mastitisa svodio se na primenu brzih štalskih metoda. Klinički mastitisi nisu problem za dijagnostiku, zbog jasnih kliničkih simptoma, ali su veliki problem supklinički mastitisi. Najčešće metode koje se koriste u dijagnostici ovih mastitisa su *White Side test* i *CMT test* (Kalifornija mastitis test, Šalmov test) (Sharma i sar., 2011; Magaš, 2012).

Granični nivoi svakog od ovih testova zavise od lokalnih uslova i važećih državnih propisa, a najčešće se navodi granica od 3×10^5 somatskih ćelija u 1 mL mleka, mada se i ona stalno smanjuje u razvijenim zemljama (Hristov, 2002). Istovremeno, treba primeniti i predmuznu probu, kojom bi se ustanovilo da li postoji neki poremećaj u sekreciji mleka.

Vajtsajd test (engl. *White Side test*) se zasniva na reakciji natrijum hidroksida i nukleinske kiseline leukocita, pri čemu se stvara natrijumova so nukleinske kiseline. Proba se izvodi na taj način što se na mikroskopsku pločicu stavi pet kapi mleka i dve kapi 1 mmol/l rastvora NaOH, a zatim staklenim štapićem dobro izmeša tečnost na površini oblika kruga u prečniku 3 cm. Ako mleko potiče iz zdravog vimena, tečnost ostaje homogeno zamućena, dok se u mleku sa povećanim brojem ćelija za nekoliko sekundi do pola minute izdvoje sitne ili krupne pahuljice u bistroj tečnosti. Kod jako pozitivne reakcije obrazuje se gusta sluzava masa. Na osnovu Vajtsajd testa može se približno odrediti broj leukocita u 1 mL mleka (Magaš, 2012).

Obeležavanje nalaza vrši se prema jačini reakcije:

homogeno zamućenje	-
sitne pahuljice, do milion leukocita	+
krupnije pahuljice, od 2 do 5 miliona leukocita	++
krupne pahuljice, do 7 miliona leukocita	+++
sluzava masa, preko 10 miliona leukocita	++++.

CMT test (kalifornija mastitis test, Šalmov test) se zasniva na dejstvu površinski aktivne materije (alkilarilsulfonat) na DNK polimer iz leukocita u mleku. Pri tome se odvaja DNK, a proteinski deo spontano prelazi u gel. Za ovu reakciju je potrebno prisustvo živih leukocita, u kojima je DNK sposobna da reaguje sa površinski aktivnom materijom. Ovo je razlog što reakcija izostaje posle dužeg stajanja, kao i u hladnom mleku. Stoga je ovaj test isključivo štalska proba.

Za izvođenje testa su potrebni reagens i plastična posuda podeljena u četiri dela (testator) za uzimanje mleka iz svake četvrti. Mleko se iz svake četvrti izmuže u odgovarajući odeljak, posuda se nagne skoro uspravno da se višak mleka odlije i u odeljcima ostane potrebna količina mleka, koja iznosi oko 2 mL. Zatim se pipetom doda oko 2 mL reagens, dobro izmeša i očita se broj leukocita u 1 mL na osnovu sledeće šeme:

negativna	-	(ispod 200.000 leukocita, bez promena u konzistenciji);
sumnjiva	±	(do 550.000 leukocita, neznatna promena u konzistenciji);
slabo pozitivna	+	(do 1.500.000 leukocita, postepeno zgrušavanje mleka);
izrazito pozitivna	++	(do 5.000.000 leukocita, momentalno zgrušavanje mleka);
jako pozitivna	+++	(preko 5.000.000 leukocita, stvara se želatinozna masa).

Ove brze štalske metode još uvek su najčešći način dijagnostikovanja supkliničkih mastitisa, mada se sve češće u literaturi nalaze radovi u kojima je praćenje supkliničkih mastitisa vršeno ELISA testom.

Primenom ELISA testa se mogu izmeriti antigeni direktnom metodom (sendvič metod) ili antitela (indirektni ili kompetitivni test). U ELISA testu se najčešće koriste enzimi alkalna fosfataza ili peroksidaza. U indirektnom ELISA testu, za određivanje antitela, poznati antigen se nanosi na polistirensku mikrotitar ploču, u koju se tada nanose ispitivani uzorci i kontrole. Posle inkubiranja, polja se isperu puferskim rastvorima i dodaje se antiglobulin konjugovan enzimom (Quinn, 2002). Na kraju se dodaje specifičan supstrat, indikator, koji razvija reakciju u vidu pojave boje čiji je intenzitet proporcionalan količini prisutnih antitela u ispitivanom serumu i očitava se pomoću spektrofotometra (ELISA čitač), a izražava se preko *Optical Density* (OD), odnosno, optičke gustine.

Otkrivanje antigena u uzorku se može izvesti pomoću antitela, koja su konjugovana enzimom. Na polistirensku mikrotitracionu ploču nanose se specifična antitela, dodaje se ispitivani uzorak i, ako je antigen prisutan u uzorku, vezuje se za antitela i ostaje vezan i posle ispiranja. Zatim se dodaju sekundarna antitela obeležena enzimom, koja su specifična za antigen, a posle dodavanja supstrata dolazi do razvijanja boje. Intenzitet boje je direktno proporcionalan količini ispitivanog antigena, a izražava se preko OD. Većina ovih testova nije komercijalnog tipa, nego se sastoje iz delova u specijalizovanim laboratorijama (Magaš, 2012).

Standardni test za određivanje titra antitela u mleku za *S. aureus* opisali su u svom radu Grove i sar. (1992). *ProStaph Elisa test* (ProStaph, ProCorp. Sterling, VA) omogućava tačnost rezultata od 97% u otkrivanju intramamarnih infekcija izazvanih bakterijom *S. aureus*. Test ima 92% tačnosti u otkrivanju pozitivnih grla i 100% tačnosti u otkrivanju krava

negativnih na *S. aureus*. Ovaj autor smatra da se test može iskoristiti na farmama u samokontroli stada na supkliničke mastitise. El-Rashidy i sar. (1992) opisuju još jedan standardni test *Staph-Trac* (Analytab Products, Plainview, NY), za dijagnostikovanje intramamarnih infekcija izazvanih bakterijom *S. aureus*. U ovom testu se analizirano mleko unosi u polja mikrotitracione ploče, na koja je adsorbovan antigen *S. aureus*. Ploča se inkubira 30 minuta na 37°C i dodaje se anti-bovini imunoglobulin, koji je konjugovan sa peroksidazom. Nakon toga se ploča ispere, doda se enzim substrat i ponovo inkubira. Prisustvo antitela se očitava kolorimetrijski na OD od 490 nm. Ovaj test je pokazao nedostatak u čitanju rezultata intramamarnih infekcija dajući do 15% lažno negativnih rezultata, što zahteva dodatna ispitivanja testa u cilju njegove komercijalne primene.

Rogerson i sar. (2000) opisuju komercijalni test za određivanje specifičnih IgG1 (*Coltest*) i IgG2 (*Mastest*) u mleku ovaca i koza i *Bovtest* za određivanje antitela kod krava. Ovi testovi su od velike pomoći u mlekarama na Novom Zelandu, gde se koriste za ispitivanje mleka, koje potiče od životinja sa supkliničkim mastitisima izazvanih bakterijom *S. aureus*. Slično ovome, Fox i Adams (2000) su opisali komercijalni test *Staphylococcus Aureus Antibody Test Kit* (VMRD, USA), a njegova uloga je u otkrivanju specifičnih anti - *S. aureus* antitela u mleku krava. Prednost ovih komercijalnih testova je u otkrivanju antitela u mleku i veoma su jednostavni za upotrebu (Magaš, 2012).

ELISA testovi su ranije korišćeni samo za serume, a test se sastavljao iz mnogo delova, koji su pripremani u posebnim laboratorijama.

U pripremi vakcina protiv stafilokoknih infekcija mlečne žlezde korišćeni su celi inaktivisani mikroorganizmi, zatim, delovi bakterije *S. aureus*, ili toksoidi, što je jedan od razloga zašto se mnogi autori opredeljuju za pripremu sopstvenih ELISA testova za *S. aureus* (Opdebeeck i Norcross, 1985; Loeffler i sar., 1987; El Rashidy i sar., 1992; Watson, 1992; Nickerson i sar., 1999; Guidry i sar., 1994; Nordhaug i sar., 1994, 1994a; Carter i sar., 2003; Lee i sar., 2005) i *Str. agalactiae* (Abubakar i sar., 2006; Avais i sar., 2007; Xu i sar., 2011) (izvor: Magaš, 2012).

2.3.3.2. Ekonomski aspekti pojave mastitisa

Osnovnu vrednost sirovog mleka čini njegov nepromenjen prirodni sastav,. Ono treba da potiče iz zdravog vimena i da je što manje izloženo kontaktnoj infekciji. Normativi

kvaliteta sirovog mleka su dobro poznati, a isto tako i činjenice o nizu propisa i mera u obezbeđivanju proizvodnje i prerade zdravog i kvalitetnog mleka (Jakovac i Mašek, 1971).

Pored velikih zdravstvenih problema, koje izaziva u zapatima visokomlečnih krava, mastitis predstavlja vrlo značajnu stavku u ekonomiji i zdravstvenom menadžmentu farme (Sharma, 2007; Magaš, 2012; Đoković i sar., 2014). Česte pojave mastitisa mogu načiniti krave potpuno beskorisnim u proizvodnji mleka. Brojni podaci ukazuju da su, i kada se radi o manje čestim infekcijama, gubici usled posledica mastitisa i dalje ozbiljni.

Smatra se da mastitis uzrokuje veće ekonomske štete u proizvodnji mleka nego druge bolesti krava. Štete usled pojave mastitisa i smanjenja sekrecije mleka predstavljaju oko 70% svih gubitaka u produkciji mleka, dok se u razvijenim zemljama više od 50% svih intervencija na farmama krava muzara odnosi na oboljenja vimena (Stojanović i Katić, 1994).

Pod poremećenom sekrecijom vimena se podrazumevaju sve promene u sastavu mleka u vezi sa bolestima krava ili vimena. Ovakvo mleko je nepodesno za kvalitetnu mlekarску preradu, a poremećena sekrecija uzrokuje i ukupno smanjene proizvodnje mleka (Jakovac i Mašek, 1971).

Prema navodima Majića (1995), godišnje štete u SAD izazvane mastitisima iznose preko 1,3 milijarde dolara, odnosno, oko 11% vrednosti godišnje proizvodnje, pri čemu se 70% ovog iznosa odnosi na supkliničke mastitise, 11% na odbačeno mleko, a 1,7% na usluge lečenja. Jakovac i Mašek (1971) navode da hronični kataralni mastitis, koji je procentualno mnogo češći od ostalih oblika upale vimena, može direktno usloviti štete u proizvodnji mleka. One, između ostalog, podrazumevaju: manje mleka (10% ili i više), mleko lošijeg kvaliteta i ranije isključivanje krava iz uzgoja i proizvodnje.

Štete koje nastaju od smanjene proizvodnje mogu se izračunati prema *ERNST*-ovoj formuli, prema kojoj treba računati sa oko 10% gubitaka u proizvodnji mleka ukoliko je na nekom području ili u staji 20% krava u prosečno dve četvrti vimena zaraženo sa bakterijom *Streptococcus agalactiae*. Za štete nastale usled preranog isključenja krava iz uzgoja i proizvodnje u 50% slučajeva su uzrok mastitisi. Te su štete posebno značajne i izražene u uzgojima usmerenim na visoku proizvodnju mleka (Jakovac i Mašek, 1971).

Budući da mastitisi nanose velike štete mlekarstvu i uzgoju visokomlečnih krava, postoji puno opravdanje za permanentnu kontrolu kvaliteta sirovog mleka proizvođača radi

otkrivanja bolesti vimena, pri čemu bi se smanjili i troškovi lečenja i odbacivanja mleka zbog prisustva antibiotika.

2.4. Mastitisi krava - prevencija i terapija

Klinički i supklinički slučajevi mastitisa se nalaze u odnosu 1:4 (Majić, 1995), odnosno, 2-3% prema 97-98% (Stojanović i Katić, 1994), što govori o njihovom značaju i potrebi suzbijanja.

Postoje podaci koji ukazuju da oko 30% krava u mlečnim stadima tokom života oboli od nekog oblika mastitisa. Stoga se javila potreba za sveobuhvatnim programom sprečavanja pojave i suzbijanja mastitisa. Takvi programi postoje (NIRD program - *National Institute for Research in Dairying*) i zasnivaju se na prethodnom sagledavanju statusa stada i otkrivanju inficiranih četvrti direktnim i indirektnim metodama utvrđivanja broja somatskih ćelija, izolaciji i identifikaciji uzročnika mastitisa u zapatu i izradi antibiograma. Dalji rad u ovim zapaatima je usmeren ka smanjenju stope novih infekcija i zavisno od tehnologije i osobina izazivača, skraćivanju trajanja infekcije već inficiranih četvrti i stope inficiranosti. Tako je moguće smanjiti gubitke od mastitisa za oko 65% u toku jedne godine (Hristov, 2002; Hristov i sar., 2005).

2.4.1. Širenje i prevencija mastitisa

Učestalost pojave mastitisa zavisi od načina držanja i eksploatacije krava muzara (Hristov i sar., 1997; Urošević i sar., 2002; Hristov i sar., 2005). Mogu se navesti sledeći najčešći načini širenja i prenošenja mastitisa kod krava: povreda vimena ili sisa tokom muže, muža sa nečistim rukama ili opremom, korišćenje iste krpe za brisanje vimena kod svih krava, muža zdrave krave nakon muže obolele krave, izostavljanje domuzavanja mleka iz vimena, stres za vreme odbijanja teleta u toku laktacije, insekti prisutni u štali i telad koja sisa više krava među kojima može biti i obolelih.

Loši higijenski uslovi pri muži, uz propuste pri dezinfekciji naročito sisa i ruku muzača, olakšavaju kontaminaciju pomuženog mleka iz okoline (Hristov i sar., 2002). Osim toga, prisustvo organskih nečistoća, i pored (ne)kvalitetnog pranja i brisanja, na vimenu i rukama muzača, koji gone krave tapšući ih po vratu ili sapima i često propuste nakon toga da operu ruke, znatno smanjuje efikasnost dezinficijensa (Hristov i sar., 1997).

Da bi se prevenirala pojava mastitisa, treba obratiti pažnju na tri faktora:

1. stanje samih krava: kravama treba obezbediti energetski dobro izbalansiran obrok kako bi bile otporne na infekciju; treba ih izdašno snabdevati selenom, vitaminom E i bakrom; izbegavati izlaganje krava raznim vidovima stresa; sprečiti povredu vimena i sisa neadekvatnom mužom; potpuno izmusti krave pri svakoj muži; obratiti pažnju na edem vimena; nikad ne hraniti telad sa kontaminiranim mlekom jer se mogu inficirati; prati, sušiti i dezinfikovati sise pre i posle muže; prati ruke i opremu za svaku mužu; za svaku kravu koristiti drugu krpu za brisanje vimena; odvojiti i izmusti obolela grla; škartirati grla kod kojih se često javlja mastitis;
2. uzročnici mastitisa: obratiti pažnju na vrstu, način širenja i količinu uzročnika; održavati dobru higijenu štale, muznih mašina, vimena i higijenu muzača;
3. smeštaj: obezbediti odgovarajuću klimatizaciju u štali (ventilacija, promaja, temperatura, relativna vlažnost zemljišta); obezbediti čiste i suve ležaje tj. prostirku za krave; obezbediti pravilno funkcionisanje muznih mašina.

Poznato je da u nastanku mastitisa različite etiologije veliki značaj ima nivo higijene u staji. Smanjenje stope novih infekcija vimena krava podrazumeva dezinfekciju sisa posle svake muže, održavanje aparata za mužu, dezinfekciju muznih čašica, pranje vimena pre muže toplom tekućom vodom i niz drugih higijensko-sanitarnih mera. Kontrola aparata za mužu ima veliki značaj u prevenciji novih infekcija u stadi (Adamović i sar., 1996; Hristov i Anojčić, 1998; Hristov i sar., 2005).

Za dezinfekciju papila posle muže koriste se dezinficijensi, koji u sebi sadrže i repelente protiv ujeda insekata, a da pri tome ne oštećuju kožu papila, potpomažu saniranje lezija, uništavaju mikroorganizme i odbijaju insekte, a ne utiču na zdravstvenu ispravnost mleka.

Dezinfekcija aparata za mužu i sisnih čaura ili čaša obavlja se tako što se sisne čaure potope u dezinficijens. Moguće je sisne čaure potopiti i u toplu vodu u trajanju 10 minuta, ali taj način dezinfekcije usporava mužu, a sisne čaure brže propadaju, što dovodi do veće mogućnosti za nastanak infekcije. Povratno ispiranje vodom pri temperaturi od 85°C u trajanju od 5 sekundi smanjuje kontaminaciju sisnih čaura bakterijama i pogodno je za izmuzišta tipa riblje kosti (Magaš, 2012).

Hristov i sar. (2005) navode da su slobodni način držanja krava i primena dezinfekcije vimena u vidu aerosola superniorniji u odnosu na vezani sistem i druge vidove dezinfekcije. Tako je moguće obezbediti bolje higijenske uslove na farmi, smanjiti infektivni pritisak na vime i uticaj stresa usled skraćivanja kretanja kao nespecifičnog faktora u nastanku upale vimena i drugih oboljenja, i postići veći komfor životinja na farmi.

Budući da krava više od polovine vremena provede ležeći i preživajući hranu, prema nekim autorima (Blood i sar., 1988), odsustvo prostirke i gumena podloga ležišta u stajama stoje u pozitivnoj korelaciji sa pojavom mastitisa. Tako, pod i prostirka kontaminirani izazivačima mastitisa uz izostanak ili lošu primenu higijenskih mera, omogućavaju kontaminaciju vimena kroz sisni kanal, pri čemu veliki broj krava doprinosi većem izlaganju vimena koliformnim i drugim mikroorganizmima, koji se razmnožavaju u prostirci.

U većini zemalja istraživanja prevalencije uzročnika ukazuju na to da je dominantni uzročnik *Staphylococcus aureus*, a zatim *Streptococcus agalactiae*.

S. agalactiae se smatra najznačajnijim patogenom na velikim farmama sa intenzivnom proizvodnjom i izaziva, uglavnom, hronične i supkliničke oblike mastitisa, ali se može suzbiti tehnički i higijenski ispravnom mužom. Prenosi se rukama mužača i priborom za mužu. Druge streptokokne vrste, kao što su *S. uberis* i *S. dysgalactiae*, uglavnom izazivaju supkliničke mastitise, koji imaju sezonski karakter i u korelaciji su sa stadijumom laktacije i starošću životinje. Papile su najčešća lokalizacija ovih uzročnika (Hristov i sar., 1997), a njihovom dezinfekcijom se ovi uzročnici inaktiviraju (Majić, 1995). U tu svrhu se pre i posle muže primenjuju različiti dezinficijensi (Hristov i sar., 2005), obično iz grupe jodofora sa dodatkom glicerina ili lanolina u cilju zaštite kože (Boddie i sar., 1993), zatim, hlorheksidinski preparati (Hogan i sar., 1995), dodecil sulfonski preparati (Pankey, 1989), ili preparati na bazi hipohlorita (Boddie i sar., 1998).

Kao preventivna mera se može smatrati i terapija mlečne žlezde u zasušenju, s obzirom da u narednoj laktaciji treba obezbediti što duži period odsustva infekcije vimena. Ona podrazumeva lokalnu aplikaciju antibiotika širokog spektra delovanja nakon poslednje muže, ili ciljanim preparatima prema prethodno urađenom antibiogramu (Pavlović i sar., 2001).

Pored prevencije i sprečavanja prenošenja infekcija mlečne žlezde, u poslednje vreme se velika važnost pridaje njenom prirodnom odbrambenom mehanizmu, koji je pretežno celularnog tipa. Ovu prirodnu barijeru mlečne žlezde čine anatomski pravilno razvijeno vime i sisa, epitel sisnog kanala, Firstenbergova rozeta, kao i faktori rezistencije čitavog organizma, kao što su kondicija i konstitucija, i oni se mogu nazvati „prvom linijom” odbrane mlečne žlezde od mikroorganizama. Kada mikroorganizmi prođu ovu liniju odbrane i prođu u cisternu, sreću se sa „drugom linijom” odbrane mlečne žlezde, koju sačinjavaju somatske ćelije u mleku, lizozim, laktoferin i komplement, koji su označeni kao laktenini i imunoglobulini. Oni su odgovorni za specifičan imunološki odgovor (Magaš, 2012).

Zdrava i neoštećena koža vimena, a posebno na papilama – sisama, je jedan od faktora koji doprinosi sniženju rizika od bakterijske kontaminacije vimena. Ona predstavlja barijeru za prodor vode sa površine ka unutrašnjosti, kao i za gubitak tečnosti iz tkiva. Smatra se da, ako procenat vode u orožalom epitelu padne ispod 10%, dolazi do njegovog pucanja (Blank, 1953) i tada može da dođe do gubljenja zaštitnih kiselih materija kože, kao što su mlečna kiselina, slobodne masne kiseline i aminokiseline (Raab, 1990). Ove promene u epitelu kože pogoduju razmnožavanju patogenih bakterija, pre svega *S. aureus* na papilama, a time i mogućnosti nastanka intramamarne infekcije (Pankey i sar., 1984).

Smatra se da anatomski pravilno razvijeno vime i sise smanjuju mogućnost pojave mastitisa. Pod tim se podrazumeva pravilan oblik vimena, kao i veličina sisa i sisnog kanala. Nije poželjno da se u eksploataciju uključuju životinje sa pasisama ili nepravilnim oblikom sisa i sisnog kanala, jer to povećava rizik od nastanka mastitisa. Prema Hamann-u (2000), sisni kanal je prosečno dugačak oko 10 mm (3-18 mm), a prečnik mu iznosi 2 mm, te se smatra da je veći procenat infekcija kod životinja sa većom prohodnošću kanala. Redovnom mužom, tj. efektom ispiranja, može se smanjiti broj mikroorganizama koji su naselili sisni kanal (Magaš, 2012).

Sisni kanal je iznutra obložen višeslojnim epitelom (*stratum granulosum*, *stratum corneum*), koji odgovara sloju keratina koji zatvara lumen kanala između dve muže. Količina keratina u sisnom kanalu se kreće u proseku oko 7 mg (2-14 mg). Keratin, koji se nalazi u sisnom kanalu, je bogat esterifikovanim i neesterifikovanim masnim kiselinama, a posebno palmito-oleinskom i linoleinskom kiselinom. On ima vrlo izražen antimikrobni efekat, te predstavlja mehaničku barijeru u sisnom kanalu, posebno u periodu zasušenja. Iz keratina su

izolovani i pojedini katjonski proteini, kao što je ubikvitin, koji inhibira rast *Streptococcus agalactiae* i *Staphylococcus aureus* (Nickerson, 1985).

Isto tako je utvrđeno da mleko sadrži supstance koje inhibitorno deluju na sakupljanje i razmnožavanje bakterija i koje su označene kao laktenini. Naziv laktenini odnosi se na komplement, lizozim, laktoferin i laktoperoksidazu (Tizard, 1996), a u mleku zdravih četvrti se nalazi veoma mala količina komponenti sistema komplementa.

Jedan od stalnih sastojaka mleka je i lizozim. To je bazni protein, koji je opisan još od strane Fleminga 1922. godine, a koji svoje baktericidno dejstvo ispoljava tako što cepa veze između N-acetil glukozamina i N-acetil muraminske kiseline u kompleksu mukoproteina ćelijskog zida bakterija (Tizard, 1996). Koncentracija lizozima u mleku zdravih četvrti je niska (0,13 mg/100 mL), i povećava se za vreme infekcije. Postoje podaci da krave sa niskom koncentracijom lizozima u mleku u većem procentu oboljevaju od mastitisa, što ukazuje da količina i nivo ovog proteina u mleku može biti pokazatelj predispozicije jedinke za pojavu mastitisa (Nickerson, 1985). Smatra se da su Gram + bakterije, generalno, osetljivije na lizozim, budući da imaju mnogo jednostavniji ćelijski zid, koji sadrži više od 90% peptidoglukana (Magaš, 2012).

Laktoferin je, takođe, jedan od glavnih sastojaka mleka i predstavlja njegov glikoprotein, koji konkuriše bakterijama vezujući za sebe gvožđe. Ovom sposobnošću on čini gvožđe nedostupnim za bakterije kao što su *E. coli* i *S. aureus*, kojima je on jedan od osnovnih elemenata za metabolizam i razmnožavanje. Laktoferin sintetišu neutrofilni granulociti, makrofagi i epitelne ćelije vimena (Harmon, 1980). Njegova količina u mleku krava varira od 0,02-0,035 mg/mL, u zavisnosti od vremena laktacije i osnovna mu je funkcija da zaštiti mlečnu žlezdu od infekcije koliformnim mikroorganizmima, naročito u fazi involucije, aktivacijom fagocitoze i sistema komplementa (Magaš, 2012).

2.4.2. Terapija mastitisa

Terapija mastitisa podrazumeva, ne samo saniranje upalnih promena na vimenu, nego i eliminaciju mikroorganizma iz vimena. Time se uklanjaju glavni izvori infekcije, iz kojih se, naročito u nepovoljnim higijenskim uslovima, mastitis širi bilo u susedne zdrave četvrti vimena, ili, pak, u vime drugih grla (Jakovac i Mašek, 1971). Lečenje mastitisa je uspešnije

ako postoje odgovarajuće informacije o uzročniku (izolacija, identifikacija i antibiogram) (Pavlović i sar., 1996).

Terapija akutnog i hroničnog kataralnog mastitisa se sprovodi lokalno (intracisternalno) i parenteralno. Lokalna terapija se sastoji u tome da obolele krave treba odvojiti i izmuzati nakon zdravih životinja. Najčešći prouzrokovatori ovog mastitisa su bakterije iz roda *Streptococcus* (*S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*). Kod kliničke forme mastitisa potrebno je aplikovati visoku dozu penicilina G (2-4 miliona IJ/po četvrti/po aplikaciji), ili polusintetskog penicilina (Gruneth, 1996; Pavlović i sar., 2001). Kod streptokoknih mastitisa ređe se koriste drugi antibiotici, zato što su streptokoke osetljive na penicilinske preparate, koji su lek izbora za ove mastitise. Ako dijagnoza nije sigurna ili potvrđena, treba koristiti lokalnu intracisternalnu aplikaciju antibiotika širokog spektra (500 mg ampicilina, 200-300 mg cefalosporina ili 500 mg tetraciklina, pri čemu treba biti oprezan jer iritiraju vime) (Gruneth, 1996). Moguće je koristiti i razne kombinacije antibiotika u cilju proširenja spektra: gentamicin + penicilin (300 mg + 1-3 miliona i.j.) i sl. Prema Tyler-u i sar. (1992), pre tretmana životinji treba dati oksitocin 20 IJ intravenozno, dobro je izmusti, a obolelu četvrt treba dobro isprati fiziološkim rastvorom. Terapiju ponavljati na svakih 12-24 sata. Kod parenteralne terapije mora se imati u vidu da je zbog infekcije vimena narušena barijera krv-mleko, te nije omogućen prolazak antibiotika kroz lipidnu membranu u obimu kao što je to kod očuvanog vimena (Magaš, 2012). U tim slučajevima je indicirano davanje pentamat-hidrochlorpenicilina (5-10 miliona/IJ i makrolidnih antibiotika - 3-5 g eritromicina, tilozina) (Gruneth, 1996).

Brown i Scasserra (1990) navode da je *S. agalactiae* osetljiv u 95% slučajeva na linkomicin i spektinomycin. Ako se sumnja da su izazivači iz roda *Staphylococcus*, u praksi su se dobro pokazali antibiotici, koji nisu osetljivi na enzim penicilinazu (oksidicilin 400-1000 mg/po četvrti), koju sintetišu ove bakterije (Magaš, 2012). Kod stafilokoknog mastitisa se mogu koristiti i cefalosporini, makrolidi, u navedenim dozama, kao i tetraciklini (400 mg) (Pyorala, 2002).

Najveći značaj u mlečnim zaptima ima mastitis hroničnog ili supkliničkog toka, izazvan bakterijom *S. aureus*, ali se ovaj mastitis može javiti i u perakutnom toku, sa posledičnom gangrenom, izazvanom toksogenim sojevima uzročnika. Smatra se da koža vimena i mleko inficiranih krava predstavljaju glavni rezervoar bakterije *S. aureus*, koja

dovodi do nastanka mikroapscesa i prodire duboko u tkivo, što predstavlja jedan od razloga neuspeha antibiotske terapije (Katić i Stojanović, 1996; Pavlović i sar., 1996).

S obzirom da se u supkliničkom toku bolesti obavezno u laktaciji, leče infekcije vimena izazvane bakterijama *Streptococcus agalactiae* i *Staphylococcus aureus*, dok se ostali uzročnici samo identifikuju, potrebno je da se uradi antibiogram i za ostale uzročnike, kako bi se u zasušenom periodu lečili odgovarajućim antibiotikom (Gruneth, 1996). Preparati koji se koriste u periodu zasušenja su posebno obeleženi za korišćenje u tom periodu, a pokrivaju kompletnu antibiotsku paletu lekova. Pravilno izvedena terapija u zasušenju sprečava nastajanje novih infekcija u tom periodu i smanjuje broj starih infekcija vimena (Pavlović i sar., 1996). Smatra se da se u ovom periodu izleči oko 80% krava obolelih od mastitisa izazvanog bakterijom *S. aureus*, u odnosu na oko 40% izlečenja u laktaciji, a da se čak do 90% streptokoknih mastitisa izleči u ovom periodu, u odnosu na 70% izlečenja u laktaciji (Boboš i Vidić, 2001; Magaš, 2012).

Terapija piogenog mastitisa se može sprovesti lokalno i parenteralno. Najčešći uzročnici ovog mastitisa su *Arcanobacter pyogenes*, ređe *S. aureus*, a veoma retko *Spherophorus necrophorus*. Promene u vimenu, koje izazivaju ovi mikroorganizmi su apostematoznog tipa. U ovom slučaju se stvaraju apscesi u parenhimu mlečne žlezde. Lečenje je moguće samo kod pojedinačnih, dobro inkapsuliranih apscesa, koji su blizu površine, nakon njihovog pucanja i otvaranja. Kod velikog broja apscesa, gde je otok tkiva obimniji, predlaže se ekonomsko iskorišćavanje životinje. Lečenje apscesa ili amputacija obolele četvrti može se sprovesti kod visoko vrednih grla, kao što su bikovske majke ili visoko mlečne rekorderke. Kod febrilnih stanja je indikovana aplikacija antibiotika širokog spektra (cefalosporini u količini od 3-5 g, ili sulfonamidi 50 g intravenski), pri čemu parenteralna terapija traje dok je životinja febrilna. Obolelu četvrt treba tokom dana što češće izmuzati i uveče aplikovati antibiotik. Terapija ne sprečava pojavu bolesti i njeno širenje, pa je prevencija jedini pravi način borbe protiv ovog mastitisa. Ona se sastoji u upotrebi insekticida, bilo u vidu zaprašivanja životinje ili upotrebom ušnih markica, koje su natopljene repelentima protiv insekata (Hillerton, 1988; Gruneth, 1996; Magaš, 2012).

Terapija flegmonoznog mastitisa se sastoji od lokalne i parenteralne terapije. Najčešći uzročnik flegmonoznog mastitisa su *E. coli* i drugi koliformni mikroorganizmi. Preporučuje se parenteralna uporeba antibiotika širokog spektra (gentamicin, tetraciklin i sl.). Kod

perakutnih stanja indikovano je intravensko davanje antibiotika, oksitocina u dozi od 30 IU intravenski, kao i velike količine dnevne kontinuirane intravenske infuzije (do 100 mL/kg telesne mase). Primjenjuje se i davanje diuretika u cilju eliminacije toksina iz krvi (Smith i Todhunter, 1985; Anderson, 1989).

Terapija granulomatoznog mastitisa je, uglavnom, samo lokalna. Na osnovu veterinarskih propisa, do sada korišćeni antimikotici (Nystatin, Clotrimazol) se ne mogu više koristiti kod goveda. Lečenje se sprovodi upotrebom Natamicina i to u količini od 1 g (100 mg aktivne supstance), koja se rastvori u 500 mL fiziološkog rastvora i aplikuje u cisternu vimena (Stanojević i Krnjaić, 2001). Obavezno je temeljno izmuzanje i ispiranje obolele četvrti (Magaš, 2012).

2.4.2.1. Intramamarni preparati za životinje u toku perioda laktacije

Intramamarni preparati se koriste u tretmanu kliničkog i supkliničkog mastitisa. Najčešće su u obliku intramamarnih suspenzija i pasti i aplikuju se u mlečni kanal pomoću mast-injektora. Da bi se odredila optimalna terapija, potrebno je utvrditi patogene izazivače oboljenja, kao i njihovu osetljivost na dostupna antimikrobna sredstva. Kada ove informacije nisu dostupne, inicijalni tretman je obično empirijski i izabran tako da deluje na širok spektar bakterija. Pored odgovarajućeg antibiotika, neki preparati u terapiji mastitisa sadrže kortikosteroide da bi se smanjila inflamacija vimena.

Mnogi sojevi *S. aureus* produkuju beta laktamazu, koja im obezbeđuje rezistenciju na određene tipove penicilina. Najbolje je da se primene u kombinaciji intramamarni i sistemski antibiotik. Lečenje treba sprovesti do kraja, čak i ako mleko povratu normalan kvalitet pre završetka terapije. Pojedinačno lečenje samo jednim od ovih lekova može da poveća verovatnoću povratka infekcije i da doprinese razvoju rezistencije. Generalno, mleko ne treba da se koristi za humanu upotrebu ako je životinja slabog zdravlja ili ako je produkcija mleka manja od 5 L na dan. Rezidue lekova u mleku, mogu da izazovu alergijske reakcije kod ljudi. Period karence za mleko i meso je strogo određen i mora se poštovati.

Terapija intramamarnim preparatima za životinje u toku perioda laktacije se može sprovesti suspenzijom sa cefoperazonom, suspenzijom sa cefkvinomom, suspenzijom sa kloksacilinom, intramamarnim rastvorom eritromicina, intramamarnim rastvorom prilimicin hidrohlorida.

U lečenju se koriste i intramamarne suspenzije složenih antibiotskih preparata, kao što su: ampicilin + kloksacilin, sulfadiazin + trimetoprim linkomicin + neomicin, benzilpenicilin natrijum + dihidrostreptomicin + nafcilin, kao i intramamarna pasta (dihidrostreptomicin + benzilpenicilin prokain). U optičaju su i složeni antibiotski preparati sa kortikosteroidima, i to: intramamarna pasta (dihidrostreptomicin + farmicetin sulfat + prednizolon), intramamarna suspenzija (neomicin sulfat + novobiocin + prednizolon + prokain benzilpenicilin + streptomicin sulfat), intramamarna suspenzija (amoksicilin + klavulanska kiselina + prednizolon), intramamarna suspenzija (dihidrostreptomicin + novobiocin + prednizolon + benzilpenicilin prokain).

2.4.2.2. Intramamarni preparati za životinje koje nisu u periodu laktacije

Terapija krava, koje nisu u periodu laktacije, se sprovodi u cilju eliminacije bilo koje supkliničke infekcije prisutne na kraju perioda laktacije, kao i da bi se prevenirala pojava novih infekcija uključujući letnji mastitis tokom perioda zasušivanja. Važno je pregledati životinje često (poželjno dva puta dnevno) u cilju što bolje kontrole pojave mastitisa. Izbor terapije u ovom periodu zavisi od više faktora, i to: patogena, koji su prisutni u stadu, trajanja perioda zasušivanja i od broja somatskih ćelija u mleku.

Kako je *S. aureus* najčešći uzročnik infekcije, antibiotska terapija treba da sadrži lekove efikasne protiv svih sojeva ove bakterije. Upotreba parenteralnih antibiotika, zajedno sa terapijom zasušivanja, može da poveća brzinu oporavka.

Kod životinja, koje nisu u periodu laktacije, mogu se koristiti intramamarni preparati sa produženim delovanjem. Formulacije preparata sa produženim delovanjem zasnovane su na primeni oleogelova sa aluminijum monostearatom.

Terapija krava, koje nisu u periodu laktacije, se može sprovesti intramamarnom suspenzijom sa kloksacilinom, kao i intramamarnom pastom sa cefalonijumom. Koriste se i intramamarne suspenzije složenih antibiotskih preparata, kao što su: ampicilin + kloksacilin + aluminijum monostearat, ampicilin + kloksacilin i dihidrostreptomicin + benzilpenicilin prokain + nafcilin.

2.4.2.3. Preparati koji služe za zatvaranje kanala mlečne žlezde

U terapiji mastitisa krava se primenjuju preparati koji formiraju fizičku barijeru na dnu kanala mlečne žlezde i tako smanjuju rizik od novih infekcija. U ovom procesu je bitno da se sisa dobro dezinfikuje pre primene kako bi se sprečio ulazak infekcije kroz injektor. Ovi preparati mogu da se koriste kao alternativa antibiotskoj terapiji tokom zasušivanja kod pojedinih životinja, pod uslovom da ne postoji supklinička infekcija.

Podaci o broju somatskih ćelija u mleku kod svake individue i podaci o kliničkom mastitisu za poslednju laktaciju treba da se analiziraju da bi se odlučilo da li kod životinje treba primeniti antibiotsku terapiju zasušivanja ili preparat, kojim će se zatvoriti kanal mlečne žlezde.

2.4.2.4. Preparati za negu sisa i vimena

Higijena i nega sisa i vimena su važni faktori u kontroli mastitisa, kao i pravilno održavanje mašina za mužu, kako bi se obezbedila pravilna cirkulacija krvi i izbegle preterane promene pritiska na dnu sisa i njihovo oštećenje.

Koža vimena može biti rezervoar mastitičnih patogena, posebno *S. dysgalactiae*, koagulaza negativnih stafilokoka i *S. aureus*, naročito ako postoje posekotine i ogrebotine. Ovi patogeni mogu da potiču iz okruženja ili sa inficiranih krava (infekcija se prenosi sa jedne na drugu kravu tokom muže). Dezinfekcija pre i posle muže uklanja ove organizme i tako se smanjuje rizik od nastanka mastitisa.

Pre muže, sise umrljane blatom ili fecesom treba oprati vodom, u koju može biti dodat dezinficijens kao što je jod. Čiste sise, zatim, treba osušiti pojedinačnim papirnim ubrusima. Upotreba zajedničkih tkanina za pranje i sušenje sisa na vimenu je strogo zabranjena zato što se tako prenosi infekcija sa krave na kravu, čak i ako se potapaju u rastvor za dezinfekciju između upotrebe. Sise moraju da se potope u kupke za dezinfekciju, jer se na taj način smanjuje broj bakterija na površini sisa pre otpočinjanja muže. Ove kupke se zadržavaju na sisama određeno vreme.

Rastvori sa dezinficijensima za potapanje vimena nakon muže smanjuju bakterijsku populaciju na sisama i pomažu da se abrazija zaleči. Bakterije, koje su eventualno prenete tokom muže, će biti uništene i tako će se ukloniti potencijalni izvor infekcije. Svaka sisa treba

da se potapa u rastvor za dezinfekciju ili da se isprska odgovarajućim sprejom nakon svake muže. Krave treba da ostanu u stojećem položaju 20-30 min nakon muže kako bi prošlo dovoljno vremena da se kanal zatvori. Na ovaj način se izbegava da bakterije uđu kroz otvoren kanal i izazovu mastitis.

Smatra se da su rastvori sa dezinficijensima za potapanje efikasniji od sprej preparata jer je cela površina vimena pokrivena, što kod sprejeva to ne mora biti slučaj. Tokom hladnog i vetrovitog vremena, treba voditi računa da krave ne napuste prostoriju za mužu pre nego što se primenjeni preparat u obliku rastvora za potapanje ili spreja osuši na mestu primene, a alternativno mogu da se koriste kreme ili masti.

Dezinficijensi, kao što su cetrimid (cetrimonijum bromid), hlorheksidin i poliheksanid su veoma efikasni protiv gram pozitivnih i gram negativnih bakterija. Međutim, oni se inaktiviraju sapunima i anjonskim supstancama.

Dodecil-benzensulfonska kiselina je efikasna protiv većine bakterija, ali je neefikasna protiv bakterijskih spora. Ima duže dejstvo u poređenju sa mnogim kupkama i prilično je efikasna u prisustvu organskih materija.

Glutaral (glutaraldehyd) je efikasan protiv gram pozitivnih i gram negativnih bakterija, ali koncentrovani rastvori sa ovim dezinficijensom mogu izazvati dermatitis. Jedinjenja joda imaju širok spektar antibakterijske aktivnosti i imaju prednost jer boje sise. Na taj način se može proveriti prekrivenost sisa dezinficijensom.

Jedinjenja hlora imaju širok spektar antibakterijske aktivnosti, ali se neutrališu u prisustvu organskih materija. Hlorna kiselina/hlor dioksid su efikasni protiv gram pozitivnih i gram negativnih bakterija, kao i protiv virusa i gljivica.

Svi preparati za negu i zaštitu vimena pre i posle muže treba da se čuvaju tako da se izbegne kontaminacija. Zaostali rastvor u posudi za potapanje vimena na kraju muže treba da se odbaci, a posuda između dve muže očisti.

Preparati za negu sisa i vimena mogu da sadrže i različite emolijense, kao što su glicerol, lanolin, beli i žuti vazelin i sorbitol, koji se dodaju preparatima da bi poboljšali hidrataciju kože, omekšali kožu i pospešili zarašćivanje lezija. Oštećena koža vimena je

podložnija infekcijama u odnosu na intaktnu. Emolijensi mogu da se primene na suve sise odmah nakon muže (Milićević i sar., 2010).

2.4.2.5. Uzroci neuspeha antibiotske terapije

Smatra se da se ni jednim lekom ne može u potpunosti sanirati obolelo stado (uspešnost lečenja se kreće između 65 i 78%), što je naročito značajno za intenzivni uzgoj mlečnih grla. U takvim slučajevima, treba sprečiti da se mastitis širi, odnosno, treba ga svesti na podnošljivi minimum. Međutim, sama okolina predstavlja izvor infekcije, a nalazimo infekcije i kod klinički zdravih krava. Ovakve latentne infekcije uvek prete da se pretvore u manifestnu bolest, koja, naročito u velikim stadima, dobija i težak ekonomski odraz. Stoga je i pogrešno suzbijati mastitis polazeći samo od nesporne činjenice da uzročnici mastitisa mogu prouzrokovati bolest i bez prisustva pojedinih faktora, koji predisponiraju vime za tu bolest. Ovakvo lečenje može doneti samo privremenu korist, koja nije dugog veka, a rezultat će biti neekonomičnost sprovedenih zahvata.

Kada se primenjuje neplansko lečenje, ono se mora sprovoditi neprestano, a mleko iz lečenih četvrti bacati, budući da nije dobro kako za ljudsku ishranu, tako i za mlekarsku preradu. Isto tako su antibiotici, koji se danima izlučuju mlekom posle lečenja, veoma štetni u daljoj preradi mleka i zdravlju potrošača.

Plansko suzbijanje mastitisa mora obuhvatati sve faktore, koji imaju ili mogu imati ulogu kod njegovog nastanka i širenja. Mere, koje se primenjuju protiv mastitisa, zajedničke su u svim oblicima upale, pri čemu se suzbijanje mastitisa ne posmatra sa stanovišta individualnog tretmana pojedinih životinja. To je pitanje čitavog stada, u kojem se nastoji da se upale vimena eliminišu i zatim stado od njih očuva. Sastavni deo mera je kontrola vimena, koju treba sprovoditi pravilno i trajno, i to ne samo u stadima gde je suzbijanje mastitisa u toku, nego i u onima, koja su sanirana i gde mastitisa još nema (mladi uzgoji). Na osnovu posignutih rezultata se sprovode dalje mere: leče se obolele četvrti vimena, isključuju se iz stada grla sa neizlečivim oblicima mastitisa, ili ona koja su konstantno inficirana, uprkos tome što su lečena nekoliko puta (Jakovac i Mašek, 1971).

Uopšteno gledajući, antibiotska terapija, takođe, može biti neuspešna. Uzroci neuspeha ove terapije se mogu sagledati kroz sledeće faktore: neadekvatnu bakteriološku dijagnozu i neodgovarajući izbor hemoterapeutika; subdoziranje antibiotika, prekratak

tretman; kasno započeto lečenje; izostanak neophodnih higijensko-sanitarnih mera tokom i nakon terapije; antibiotici ne dostižu adekvatnu koncentraciju na mestu infekcije (resorpcija, dispozicija, eliminacija, jonizacija, difuzione barijere tokom tretmana - edem, apscesi, fibroza, nekroza); problem penetracije antibiotika kroz barijeru mlečne žlezde tokom parenteralnog tretmana; vezivanje antibiotika za proteine seruma ili mleka i inaktivacija antibiotika konstituentima mleka; intracelularni parazitizam bakterija; neki antibiotici negativno deluju na fagocite; razvoj rezistencije i adaptacija bakterija na sredinu u mlečnoj žlezdi; uzročnik je prisutan u izmenjenom stanju; L-oblici bakterija, koji su neosetljivi na beta laktamsku grupu antibiotika; „izmicanje” endogenim antibakterijskim faktorima (formiranjem kapsula ili sluzi, adsorpcijom proteina domaćina za receptore bakterija, stvaranje leukocidina); „izbegavanje” efekta ispiranja izmuzanjem mleka (vezivanjem za tkivo, flotacijom naviše pri primeni lekova na bazi krema, povećanjem brzine replikacije); mehanizam reinfekcije vimena istim mikroorganizmima, kod kojeg je inflamirana žlezda osetljiva na infekciju, jer je izmenjeno mleko pogodan substrat za bakterije zbog hemskog gvožđa, aktivacije plazmina, cepanja kazeina itd.; slab imuni odgovor mlečne žlezde; razblaženost endogenih odbrambenih faktora u mleku; neutrofilni granulociti su aktivni samo kratko vreme nakon prelaska u mlečnu sredinu; suviše niska pH vrednost mleka za aktivnost granulocita; endocitoza masti i kazeina od strane fagocita; prekrivanje opsoninskih receptora kazeinom; fagociti nemaju dovoljno energije zbog niskog nivoa glukoze u mleku; parcijalni pritisak kiseonika je prenizak za normalnu aktivnost fagocita; nema dovoljno supstrata (tiocijanat i vodonik peroksid) za laktoperoksidazu, kako bi se formirao efektivan antibakterijski sistem u mleku; laktoferinski sistem nije dovoljno efikasan u odvajanju gvožđa od bakterija u mleku; komponente mleka maskiraju ili inhibiraju dejstvo aktivisanog komplementa (Bojanić Rašović, 2012).

2.5. Vitamin C (L-askorbinska kiselina)

Vitamin C je esencijalni nutrijent, koji je ljudskom telu potreban za razvoj tkiva, krvnih sudova i hrskavice. Vitamin C je, takođe, neophodan za stvaranje ATP-a, dopamina, peptidnih hormona i tirozina. Neophodan je u sintezi kolagena, pomaže funkcije telesnog obrambenog sistema, podstičući aktivnost belih krvnih zrnaca i povećavajući nivo interferona, odgovor antitela i lučenje hormona timusa. Nadalje, vitamin C pomaže

apsorpciju gvožđa, a samim tim i formiranje eritrocita, pretvara folnu kiselinu u njen aktivni oblik, deluje kao antihistaminik i na taj način može pomoći u ublažavanju simptoma alergija (<http://www.adiva.hr/dobri-stari-vitamin-c.aspx>).

Otkriće vitamina C, kao i njegovih brojnih uloga u organizmu, jedno je od velikih dostignuća 20-tog veka. Iako se smatralo da su utvrđene sve njegove funkcije i primene, kao i da su sprovedena opsežna naučna istraživanja iz više oblasti, često se pojavljuju rezultati istraživanja, koja upućuju na još neku njegovu novu ulogu ili upotrebu u svakodnevnom životu.

2.5.1. Biohemijski i biološki značaj vitamina C

Vitamin C (L-askorbinska kiselina, askorbat) je vodorastvorljivi (hidrosolubilni) mikronutrijent potreban za mnoštvo bioloških funkcija (Kucharski i Zajac, 2009). Askorbinska kiselina je prisutna u tkivima svih životinja i viših biljaka. Ljudi, majmuni, zamoorčići i neki drugi kičmenjaci ovaj vitamin ne sintetišu i stoga ga moraju unositi hranom. Međutim, većina drugih životinja i verovatno, sve biljke, mogu da sintetišu ovaj vitamin iz glukoze. Vitamin C se lako apsorbuje u crevima, te se zbog toga deficit ovog nutrijenta pripisuje neadekvatnom unosu hranom.

U živim organizmima on deluje kao antioksidans i tako štiti organizam od posledica oksidativnog stresa. Deluje kao donor elektrona za osam različitih enzima. Kao kofaktor, učestvuje u najmanje šest enzimskih reakcija, među kojima je nekoliko neophodno za sintezu kolagena i čija se disfunkcionalnost manifestuje simptomima karakterističnim za skorbut. Ove reakcije su vrlo važne kod životinja jer učestvuju u procesu zarastanja rana i sprečavanja krvarenja iz kapilara.

Askorbat (anjon askorbinske kiseline) je neophodan u nizu esencijalnih metaboličkih reakcija kod svih životinja i biljaka. Njega sintetiše veliki broj životinja, najviše sisari, a ne sintetišu ga pojedine vrste ptica i riba. Vrste koje ne mogu da sintetišu vitamin C moraju da ga unose putem ishrane i kod njih deficit ovog vitamina izaziva skorbut.

Ribe, sa nedostatakom vitamina C, oboljevaju od skorbuta, čiji su najuočljiviji simptomi skolioza i tamna boja kože. Tipičan primer su košljoribe, zatim slatkovodne pastrmke, kod kojih se nedostatak vitamina manifestuje kao krvarenje na perajima, krivljenje

kičme, smetnje u sintezi kolagena i unutrašnja krvarenja. Kada bi ove ribe živele u morskoj vodi sa algama i fitoplanktonima, vitaminska suplementacija bi bila od manje važnosti.

Biološka uloga askorbinske kiseline se vezuje za učešće u oksido-redukcionim procesima, koagulaciji krvi, regeneraciji tkiva, sintezi steroidnih hormona, pretvaranju folne u tetrafolnu kiselinu i aktivaciji mnogih enzima. Vitamin C deluje na funkcije centralnog nervnog sistema, stimuliše funkciju endokrinih žlezda, pojačava funkcije jetre, omogućava resorpciju gvožđa u crevu i učestvuje u građenju krvi (obzirom da učestvuje u sintezi prokolagena i kolagena, kao i u normalizaciji propustljivosti kapilara).

Vitamin C ima esencijalnu ulogu u povećanju efikasnosti imunološkog sistema. Nadalje, on podstiče proizvodnju interferona i povećava mobilnost neutrofilnih granulocita. Kada neutrofilni granulociti krenu putem hemotaksičnih faktora, oni se ubrzo dezaktiviraju, odnosno, ne odgovaraju na sledeće signale ukoliko nema dovoljno vitamina C. Tako se smanjuje broj neutrofilnih granulocita na potrebnom mestu. Ukoliko je organizam zasićen vitaminom C, neutrofilni granulociti odgovaraju i na drugi signal. Ovaj tip odgovora se naziva prava hemotaksična reakcija i podrazumeva potpuni odgovor neutrofilnih granulocita. Takođe, vitamin C, preko interferona, aktivira makrofage.

Vrlo važna funkcija vitamina C je povećanje fagocitne aktivnosti leukocita, koja raste linearno sa povećanjem koncentracije ovog vitamina. Takođe, on ubrzava proizvodnju limfocita, odnosno, stimuliše blastogenezu i povećava produkciju antitela, naročito IgG i IgM, ali i IgA antitela (<http://www.vitaminologija.com/vitamin-c/>)

2.5.2. Sinteza, hemijski sastav i fizičke osobine vitamina C

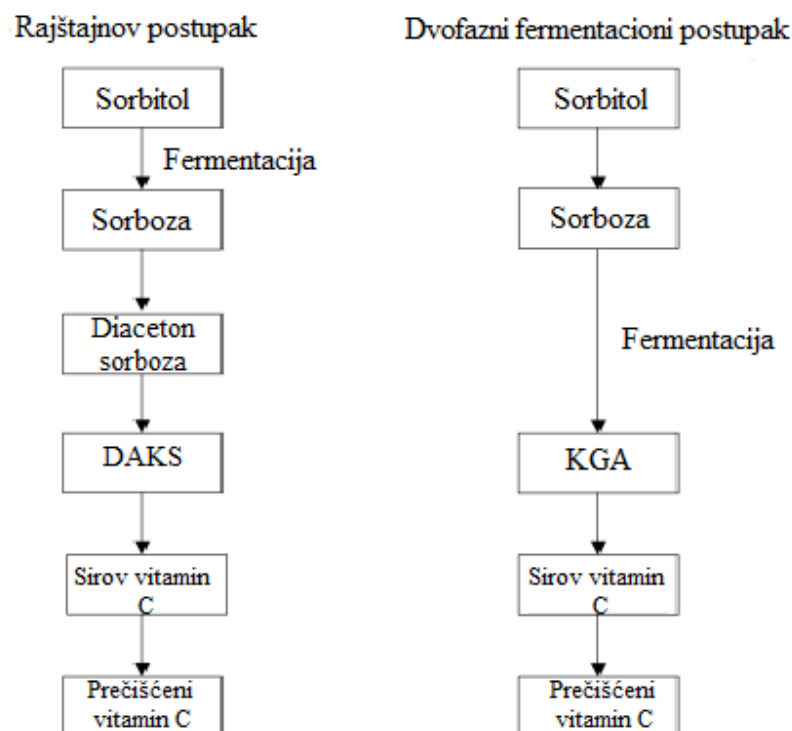
U periodu između 1933. i 1934. godine Hirs i Hejvort su uspešno sintetisali vitamin C. Osim njih, veću količinu vitamina C je sintetisao i poljski hemičar Tadeus Rajhštajn. Ovaj drugi proces sinteze vitamina C je bio podesan za jeftinu masovnu proizvodnju vitamina u većim količinama, zbog čega je počeo da se koristi u industrijskoj proizvodnji. Zbog rada na sintetisanju vitamina, kojem je najvećim delom doprineo, Hejvort je bio nagrađen Nobelovom nagradom za hemiju 1937. godine, dok je Sent Đorđi dobio Nobelovu nagradu za medicinu iste godine zbog njegovog rada na otkriću uloga vitamina C.

Rajhštajnov proces, koji predstavlja kombinaciju hemijskih reakcija i bakterijske fermentacije, se još uvek koristi za proizvodnju vitamina C. Kompanija Hofman la Roš, koja je kupila prava na patent za Rajhštajnov proces 1934., je postala prva farmaceutska kompanija koja je masovno proizvodila i prodavala sintetički vitamin C pod imenom Redokson (Kiple i Ornelas, 2000).

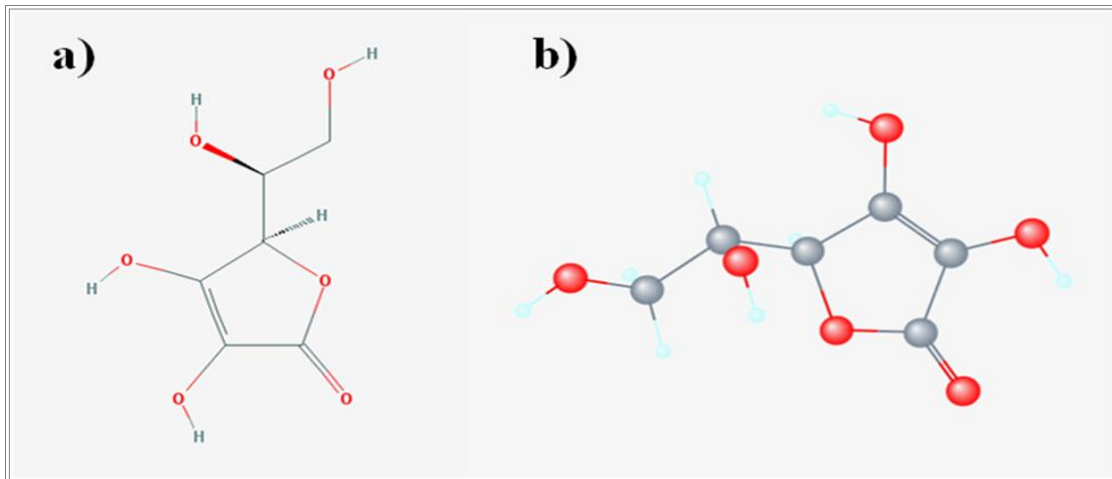
Vitamin C se sintetiše iz glukoze primenom dva glavna procesa (slika 2.30). Rajhštajnov proces, razvijen tokom 1930. godine, koristi fermentaciju, kojoj sledi nekoliko čisto hemijskih koraka. Moderni dvostepeni fermentacioni proces, originalno razvijen u Kini tokom 1960. godine, koristi dodatnu fermentaciju, kojom se zamenjuje deo kasnijeg hemijskog procesa. Prinos oba procesa je, otprilike, 60% vitamina C iz glukoze (Competition Commission, 2001).

Prema IUPAC nomenklaturi, askorbinska kiselina, odnosno vitamin C, predstavlja (R)-3,4-dihidroksi-5-((S)-1,2-dihidroksietil)furan-2(5N) i njegova strukturna formula prikazana je na slici 2.31. Njegova molekularna formula je: $C_6H_8O_6$.

Metode za dobijanje vitamina C



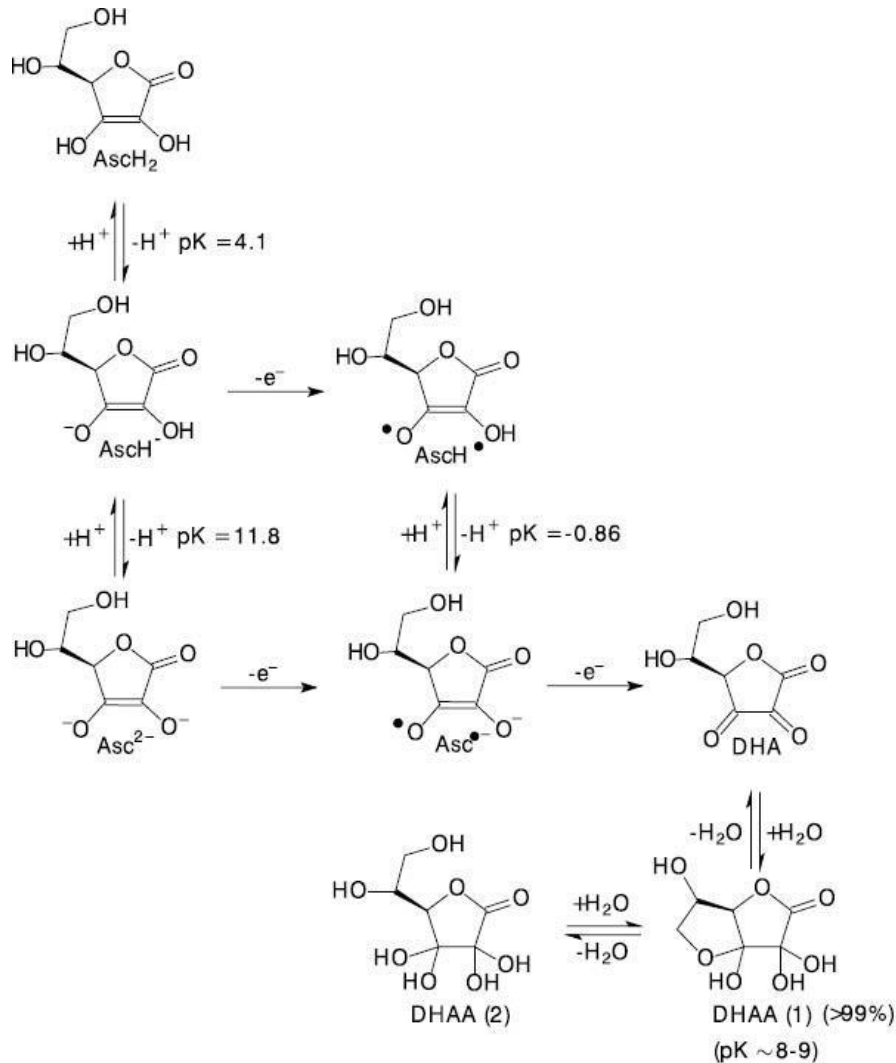
Slika 2.30. Postupci za sintezu vitamina C (izvor: BASF)



Slika 2.31. Strukturalna formula vitamina C: a) 2D; b) 3D
(http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ascorbic_acid#section=Top)

Vitamin C predstavlja L-enantiomer askorbinske kiseline, dok D-enantiomer nema fiziološkog značaja. L-askorbat je jak redukujući agens i kada deluje u tom svojstvu, konvertuje se u oksidovani oblik - L-dehidroaskorbat (slika 2.32).

L-dehidroaskorbat se može zatim redukovati nazad u aktivnu L-askorbatnu formu dejstvom enzima i glutaciona u telu. Tokom ovog procesa se formira radikal semi-dehidroaskorbinske kiseline. Slobodni radikal askorbata slabo reaguje sa kiseonikom, tako da se ne formira superoksid. Umesto toga, dva radikala semi-dehidroaskorbata reaguju i formiraju jedan askorbat i jedan dehidroaskorbat. Uz pomoć glutaciona, dehidroksi askorbat se konvertuje nazad u askorbat.



Slika 2.32. Transformacije askorbinske kiseline u dehidroaskorbinsku kiselinu (Padh, 1991; Banhegyi i sar., 1997)

Prisustvo glutationa je ovde esencijalno, jer on omogućava obnavljanje askorbata i poboljšava antioksidativni kapacitet krvi. Bez njega ne bi bilo konverzije dehidroaskorbata nazad u askorbat (Padh, 1991; Banhegyi i sar., 1997).

Sagledavajući fizičke karakteristike vitamina C, može se reći da je to bezbojna, kristalna supstanca, molarne mase 176 g/molu, gustine 1.694 g/cm³, kiselog ukusa. Jako dobro je rastvorljiva u vodi i metanolu, a oko pet puta manje u etanolu. Tačka topljenja je 190 °C, a tačka ključanja 533 °C. On gubi biološku aktivnost već na 60 °C. Uništava se kuvanjem, oksidacijom i delovanjem baza, ali je otporan na zamrzavanje. U prirodi se može naći samo L-oblik askorbinske kiseline, koji je biološki aktivan.

Askorbinska kiselina se relativno lako oksiduje kiseonikom iz vazduha, a naročito u prisustvu jona teških metala (gvožđa ili bakra). U odsustvu kiseonika, askorbinska kiselina može izdržati zagrevanje i do 100 °C (Padh, 1991).

Vodeni rastvor vitamina C je kiselkast. To je slaba kiselina i nešto je jača od sirćetne u sirćetu, a slabija od limunske kiseline u limunu ili grejpfrutu, mlečne kiseline u mleku ili tartarne u grožđu. U telesnim tečnostima je askorbinska kiselina potpuno disocirana u askorbat jon i jon vodonika. Vodonikov jon reaguje sa: baznim grupama proteina ili hidrogenkarbonatnim jonom (HCO_3). Sve fiziološke reakcije vitamina C obavlja askorbatni jon.

Natrijumove i kalijumove soli askorbinske kiseline su takođe aktivne. U oksido-redukcionim procesima C vitamin se oksidiše u dehidroaskorbinsku kiselinu, pri čemu oksidovanim agensima predaje dva atoma vodonika iz hidrosilnih grupa, koje se nalaze na petočlanom prstenu. Reakcija je reverzibilna, u kom slučaju dehidroaskorbinska kiselina prima dva atoma vodonika i prelazi u askorbinsku kiselinu. Tada deluje kao oksidans.

2.5.3. Izvori vitamina C

2.5.3.1. Prirodni izvori

Biljke su, generalno, dobri izvori vitamina C. Njegova količina u hrani biljnog porekla zavisi najviše od biljne vrste, zemljišta, klime, dužine vremenskog perioda od branja do upotrebe, uslova skladištenja i metoda pripreme. Relativna zastupljenost vitamina C u različitim sirovim biljnim vrstama (Nutrient Data Laboratory, 2010) je prikazana u tabeli 6. Podaci su aproksimativni, budući da su neke biljke analizirane u svežem, a neke u sušenom stanju.

Neki životinjski proizvodi mogu koristiti kao prehrambeni izvori vitamina C. Vitamin C je najzastupljeniji u jetri, a najmanje ga ima u mišićima. Pošto mišići sačinjavaju najveći deo mesa u ishrani, životinjski proizvodi nisu pouzdan izvor vitamina C.

Vitamin C je takođe prisutan u majčinom mleku, dok se u sirovom kravljem mleku nalazi u ograničenim količinama. Sva suvišna količina vitamina C se iz organizma izbacuje mokraćom (Clark, 2007).

Tabela 2.6. Relativni sadržaj vitamina C u različitim vrstama voća i povrća (Nutrient Data Laboratory, 2010)

Biljna vrsta	Vitamin C (mg/100 g)	Biljna vrsta	Vitamin C (mg/100 g)
Šipak	1025	Blitva	39
Peršunov list	166	Ribizla	35
Paprika (sveža)	139	Praziluk	30
Ribizla (crna)	136	Rotkva	29
Ren	114	Rotkvica	29
Kelj (zeleni)	105	Grašak	25
Mirođija	93	Malina	25
Karfiol	70	Paradajz	24
Jagoda	59	Ananas	21
Limun	53	Boranija (zeleni)	20
Keleraba	53	Paškanat	18
Pomorandža	51	Krompir	15
Kupus (crveni)	50	Orah	15
Spanać	47	Luk (beli)	14
Luk	47	Dunja	13
Kupus (beli)	46	Cvekla	10
Kelj (običan)	59	Peršun (koren)	41
Grejpfrut	45		

U tabeli 2.7. je prikazana relativna zastupljenost vitamina C u hrani životinjskog porekla (http://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_C#cite_note-124).

Tabela 2.7. Relativni sadržaj vitamina C u različitim proizvodima životinjskog porekla (http://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_C#cite_note-124)

Životinjski izvor	Vitamin C (mg/100 g)
Teleća jetra (sirova)	36
Goveđa jetra (sirova)	31
Ostrige (sirove)	30
Bakalar (pržen)	26
Svinjska jetra (sirova)	23
Jagnjeći mozak (kuvan)	17
Pileća jetra (pržena)	13
Jagnjeća jetra (pržena)	12
Teleća nadbubrežna žlezda (sirova)	11
Jagnjeće srce (dinstano)	11
Jagnjeći jezik (kuvan)	6
Ljudsko mleko (sveže)	4
Kozje mleko (sveže)	2
Mleko kamile (sveže)	5
Kravlje mleko (sveže)	2

2.5.3.2. Suplementi

Askorbinska kiselina je komercijalno dostupna u formi čistog kristalnog vitamina C i raznih obloženih proizvoda, kao što je 97,5% etilceluloza - obloženi vitamin C. Najstabilniji oblik vitamina C, koji se koristi u industriji stočne hrane, je L-askorbil-monofosfat. Stabilnost tokom skladištenja, prerade hrane i razlaganja je primarno svojstvo po čemu se postojeći oblici vitamina C značajno razlikuju (<http://www.dsm.com>).

Vitamin C je u prodaji dostupan u obliku kapsula, tableta, multi-vitaminskih i multi-antioksidativnih formulacija, kao i u obliku kristalnog praha. Tablete i kapsule su veličine od 25 do 1500 mg. Kristali vitamina C (u vidu askorbinske kiseline) su obično dostupni u bocama u količini od 300 g do 1 kg praha. Boce su obično hermetički zatvorene i smeđe ili mat obojene kako bi se sprečila oksidacija vitamina C, u kom slučaju on postaje beskoristan, ako ne i štetan.

2.5.4. Pregled ispitivanja uloge vitamina C u organizmu i ishrani domaćih životinja

Pregled rezultata, koji se odnose na naučna istraživanja iz oblasti proučavanja uloge vitamina C u organizmu i ishrani domaćih životinja, se može sagledati kroz sledeće pravce: **1. ocena potreba organizma za vitaminom C** (Anderson i sar., 1980; Ataman i sar., 2010; Bjelakovic i sar., 2008; Black i Hidiroglou, 1996; Bouda i sar., 1980; Cappa, 1958; Chanda, 1958; Chatterjee, 1973, 1978; Cromwell i sar., 1970; Douglas i sar., 2004; Dvorak, 1964; Hidiroglou i sar., 1995; Hidiroglou i sar., 1997; Hidiroglou, 1999; Itze, 1984; Kolb, 1962; Kremer i sar., 1999; MacLeod i sar., 1996; MacLeod i sar., 1999; Mac-Pherson, 1983; Mohamed i sar., 2004; Mourot i sar., 1990; Nikolić, 2007; Nockels, 1988; NRC, 1998; NRC, 2001; Padilla i sar., 2006; Santos i sar., 2001; Schwager i Schulze, 1998; Seifi i sar., 2010; Sivakumar i sar., 2010; Takahashi i sar., 1999; Toutain i sar., 1997; Tsao, 1997; Wariss, 1984; Yen i Pond, 1981; Weiss, 2001); **2. ocena uzroka i posledica nedostatka vitamina C u organizmu** (Beisel, 1982; Cole i sar., 1944; Cummins i Brunner, 1989; Cummins i Brunner, 1991; Cummins, 1992; De-Rodas i sar., 1998; Dobsinska i sar., 1981; Duncan, 1944; Eicher-Pruiett i sar., 1992; Hemingway, 1991; Hemila i Douglas, 1999; Hidiroglou i sar., 1977; Hidiroglou i sar., 1995; Itze, 1984; Jagos i sar., 1977; Kolb, 1984; Lykkesfeldt i Svendsen, 2007; Mackenzie i sar., 1997; MacLeod i sar., 2003; McDowell, 2000; McKee i Harrison, 1995; Miller i Brezezinska-Slebodzinska, 1993; Miller i Kornegai, 1983; Mitchell i Russo, 1983; Padilla i sar., 2005; Padilla i sar., 2006; Palludan i Wegger, 1984; Pribyl, 1963;

Sahin i sar., 2003; Sahinduran i Albay, 2004; Sauberlich, 1994; Seifi i sar., 1996; Tanaka i sar., 2008; Wegger i Moustgaard, 1982) i 3. **ocena potencijalne toksičnosti vitamina C u organizmu** (NRC, 1987; Leeson i Summers, 2001).

2.5.4.1. Potrebe organizma za vitaminom C

Maksimalana telesna zaliha vitamina C u telu je određena bubržnim pragom. Mnoga tkiva održavaju koncentraciju askorbinske kiseline na znatnom većem nivou u odnosu na mogući nivo u krvi. Neki telesni organi, kao što su hipofiza ili timus, mogu da akumuliraju i do sto puta veću koncentraciju askorbinske kiseline u odnosu na krvnu plazmu. Organi sa 10 do 50 puta većom koncentracijom vitamina C su pluća, testisi, mozak, jetra, štitasta žlezda, bubrezi, pankreas i pljuvačne žlezde (Douglas i sar., 2004; Bjelakovic i sar., 2008).

Askorbinska kiselina se sintetiše u jetri većine sisara (Chatterjee, 1978). Većina biljnih i životinjskih vrsta sintetiše vitamin C iz monosaharida, kao i iz glukoze i galaktoze. Domaće životinje, uključujući preživare, imaju sposobnost da sintetišu vitamin C, pri čemu organizam mladunaca preživara do četiri meseca starosti ne može da proizvede potrebnu količinu askorbinske kiseline (NRC, 2001). Međutim, koncentracija askorbinske kiseline u organizmu u potpunosti zavisi od njene biosinteze, budući da mikroorganizmi buraga skoro potpuno degradiraju suplementni vitamin C (Nockels, 1988) (tabela 8).

Tabela 2.8. Koncentracija askorbinske kiseline (mg/L) u plazmi kod zdravih životinja i ostalih domaćih preživara prema različitim referentnim izvorima

Životinjska vrsta	Koncentracija (mg/L, raspon)	Referenca
Goveda	2.85-4.81	Ataman i sar. (2010)
	2.97-3.63	Padilla i sar. (2006)
	5.42-5.99	Mohamed i sar. (2004)
	5.70-6.20	Chanda (1958)
Bizoni	5.30-5.50	Chanda (1958)
Ovce	4.67-4.77	Mohamed i sar. (2004)
	4.00-8.00	Mac-Pherson (1983)
Koze	1.75–1.92	Sivakumar i sar. (2010)

Glukoza je jedini prekursor askorbinske kiseline u životinjskom telu. Potrebe za glukozom su posebno povećane u laktaciji krava zbog velike produkcije laktoze u vimenu. Upravo zbog velikih potreba za glukozom, posebno u ranom periodu laktacije, MacLeod i

sar. (1999) ukazuju na smanjenu sintezu askorbinske kiseline kod visoko-mlečnih krava. S druge strane, Santos i sar. (2001) navode da faza laktacije nema efekta na koncentraciju askorbinske kiseline u krvnoj plazmi krava u laktaciji. Na osnovu dobijenih rezultata, isti autori smatraju da je organizam ovih životinja u stanju da sintetiše onu količinu askorbinske kiseline, koja zadovoljava njihove potrebe.

Vitamin C ima mnogo različitih bioloških funkcija, budući da utiče na brojne enzimske aktivnosti, posebno one uključene u sintezu kolagena (Schwager i Schulze, 1998). Kao jak antioksidans, askorbinska kiselina deluje tako što štiti limfocite od oksidativnog oštećenja (Anderson i sar., 1980). Shodno tome, Seifi i sar. (2010) su analizirali uticaj prekomerne suplementacije vitaminom C na hematološke parametare, nivo globulina, biohemijski sastav seruma i prirast neonatalne teladi rase Holštajn. Na osnovu dobijenih rezultata, ovi autori su utvrdili sledeće: broj limfocita (14. dan nakon rođenja) i monocita (30. dan nakon rođenja) je bio značajno niži u uslovima prekomernog doziranja askorbinskom kiselinom nego u uslovima kontrole; tretirana telad su imala značajno nižu koncentraciju fibrinogena 30. dana nakon rođenja; u uslovima prekomernog doziranja askorbinskom kiselinom značajno je bila povećana koncentracija albumina kod teladi 60. dana nakon rođenja; nije bilo značajne razlike u nivoima beta i gamaglobulina i odnosa albumini/globulini; ukupan prirast se između tretirane i netretirane teladi nije značajno razlikovao, ali je prirast kod ženske teladi, kojoj su u ishranu dodavane veće koncentracije askorbinske kiseline, bio značajno veći u poređenju sa ženskom teladi kontrolne grupe.

Telad se rađa sa visokim sadržajem askorbinske kiseline u krvnoj plazmi, koja se značajno smanjuje u postnatalnom periodu (Bouda i sar., 1980). Međutim, do tada je bilo vrlo malo informacija o varijacijama koncentracije askorbinske kiseline u mleku i krvnoj plazmi krava nakon porođaja i njenom uticaju na potomstvo. To je bio predmet proučavanja Hidioglou-a i sar. (1995) koji su analizirali variranje koncentracije askorbinske kiseline u uzorcima krvne plazme i mleka 6 krava, kao i krvne plazme njihove teladi u periodu od 0 do 28 dana nakon telenja. Ovi autori su utvrdili dvostruko veće koncentracije ispitivanog parametra u kolostrumu nego u mleku, 2 dana nakon telenja, kao i koncentraciju askorbinske kiseline u plazmi, koja je prvobitno bila niža kod krava nego kod njihovog potomstva, ali je dostigla isti nivo oko 28 dana nakon telenja.

Brojne studije ukazuju na sposobnost svinja da sintetiziraju askorbinsku kiselinu u jetri (Chatterjee, 1973). Shodno tome, NRC (1998) navodi da uključivanje vitamina C u vidu suplementa u ishranu svinja nije potrebno. Međutim, smatra se da nove rase svinja nisu u stanju da sintetiziraju one količine vitamina C, koje su potrebne da se zadovolje njihove potrebe tokom perioda nepovoljnih ekoloških uslova, bolesti ili drugih stresnih uslova (Wariss, 1984). Nekoliko autora ukazuje na poboljšanja u rastu (Cromwell i sar., 1970; Yen i Pond, 1981) i kvalitetu mesa (Mourot i sar., 1990; Kremer i sar., 1999) kada se ishrana svinja dopuni vitaminom C.

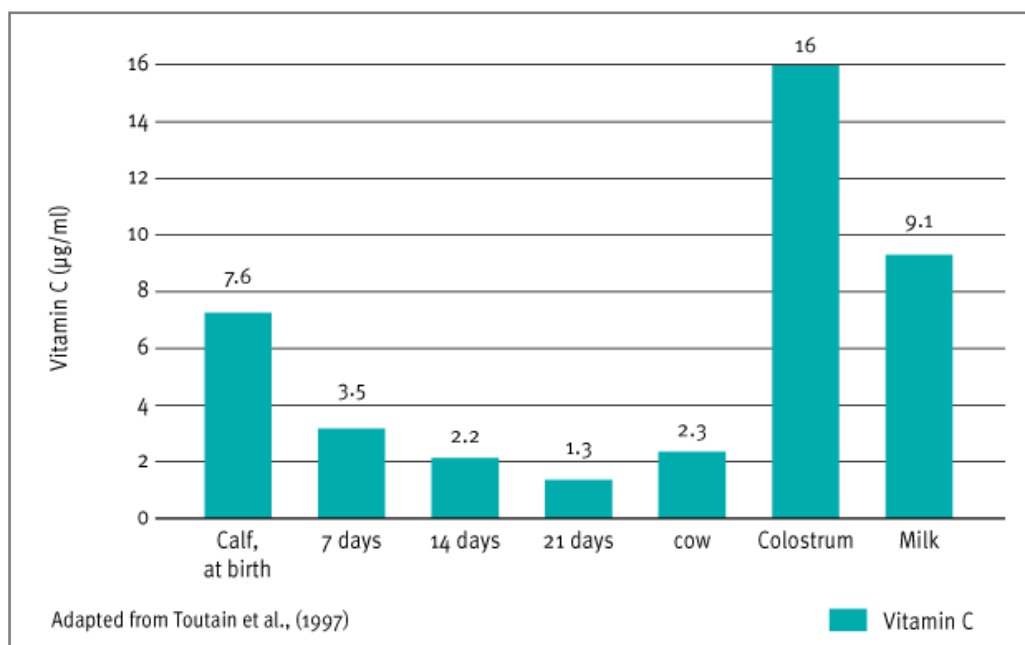
Kao hidrosolubilni vitamin, vitamin C se može lako dozirati kroz vodu za piće u kratkom vremenskom periodu, kao i u kritičnim stresnim periodima pre klanja. Međutim, vitamin C se brzo izlučuje urinom u istom trenutku kada koncentracija askorbinske kiseline u plazmi prelazi prag njene koncentracije u bubrezima (Tsao, 1997). Shodno tome, podatak koliko se brzo vitamin C metaboliše i nakon konzumiranja izlučuje, može biti od ključnog značaja za dobijanje pozitivnih rezultata kada je kvalitet mesa u pitanju.

Koncentracije askorbinske kiseline u krvnoj plazmi su niže kod teladi, mlečne teladi i junadi, koja se uzgaja u stresnim uslovima (klizav pod, hladnoća) nego kod životinja smeštenih u boljim uslovima (NRC, 2001). Stoga su date preporuke da se ishrana mlečne teladi, koja se uzgaja u stresnim uslovima, dnevno dopuni sa 200 do 2000 mg vitamina C (Kolb, 1962; Dvorak, 1964; Itze, 1984), dok se dnevne potrebe životinja smeštenih u normalnim uslovima kreću od 50 do 250 mg/kg hraniva (Nikolić, 2007).

Proučavajući uticaj ishrane dopunjene različitim količinama vitamina C na koncentraciju askorbinske kiseline u krvnoj plazmi i mleku 32 krave rase holštajn u polulaktaciji, Weiss (2001) je utvrdio da suplementacija vitaminom C nije imala efekta na sastav i prinos mleka, kao ni na povećanje askorbinske kiseline u njemu.

Postoje i studije koje se odnose na dodavanje vitamina C u ishrani tovnih goveda. Tako, Takahashi i sar. (1999), proučavajući nivo askorbinske kiseline u klinički zdravih japanskih crnih goveda, uključujući 135 teleta, 238 toвне junice, 524 toвна junca, 127 junica i krava, koje nisu u laktaciji, navode da se koncentracija askorbinske kiseline u plazmi smanjuje tokom tova, ali da pol i starost goveda nemaju efekta na nivo vitamina C u krvnoj plazmi.

Nivo vitamina C u krvnoj plazmi mlečne teladi ima tendencu smanjenja tokom prve tri nedelje života do koncentracija koje su niže od onih ustanovljenih kod krava. Kolostrum se takođe smatra dobrim izvorom askorbinske kisline, dok su njene koncentracije u mleku prilično ograničene (slika 2.33).

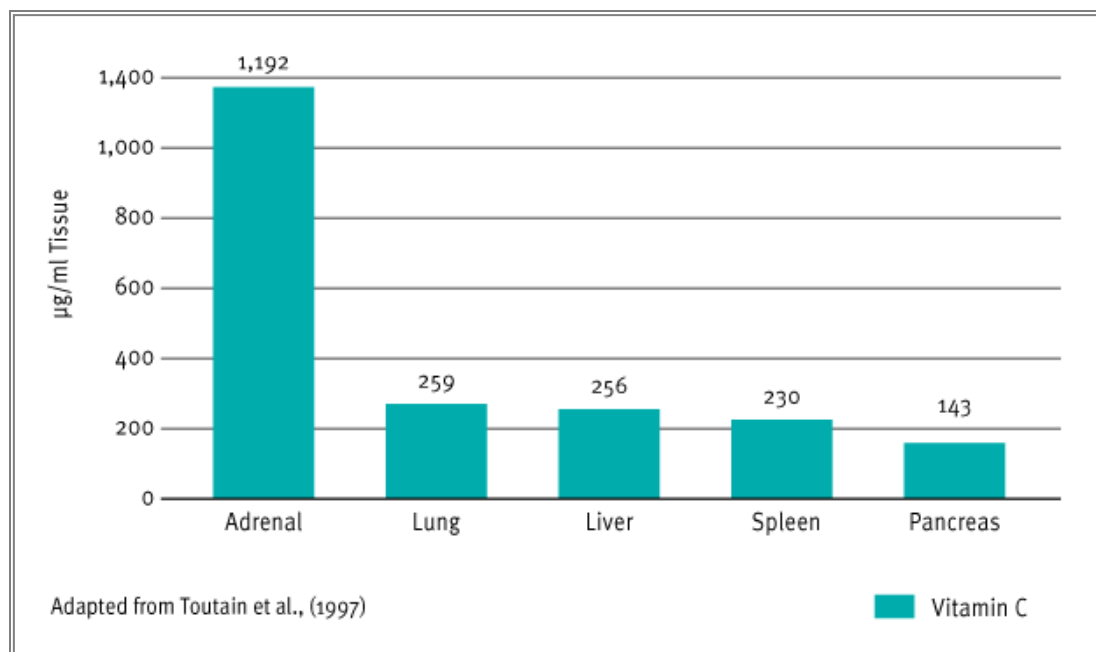


Slika 2.33. Koncentracija vitamina C u krvnoj plazmi mlečnih teladi (po rođenju, nakon 7, 14 i 21 dan) i krava, kolostrumu i mleku (Toutain i sar., 1997)

Rezultati pojedinih istraživanja ukazuju na postojanje nekoliko telesnih skladišnih pulova askorbinske kiseline (slika 34) i sugerišu da prevelike doze vitamina C kod teladi nemaju efekta i da neće biti dobro iskorišćene od strane organizma (Toutain i sar., 1997). Usvajanje i razlaganje vitamina C, koji se u vidu suplemenata dodaje u hranu domaćih životinja, zavisi od komercijalnih oblika, u kojima se on nalazi. Tako su MacLeod i sar. (1996) utvrdili da je askorbil-2-polifosfat u ishrani preživara stabilniji od kristalnog vitamina C i efikasniji u povećanju koncentracije askorbinske kiseline u krvnoj plazmi mlečnih krava.

U svojim istraživanjima Hidiroglou (1999) je ustanovio da su krave dozirane oralno sa 40 g/dan vitaminom C obloženim etilcelulozom imale viši nivo vitamina C u plazmi nego kad su dozirane sa kristalnim vitaminom C. Isto tako, proučavajući efekat različitih formi vitamina C na nivo askorbinske kiseline u krvnoj plazmi ovaca, Hidiroglou i sar. (1997) nisu

utvrdili veliku razliku između uticaja kristalnog vitamina C, etilcelulozom-obloženog vitamina C, askorbil-2-polifosfata i natrijum askorbata. Ovi rezultati nisu u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima (Cappa, 1958; Itze, 1984), koji ukazuju na značajno veće razlaganje vitamina C u kristalnom obliku u buragu preživara.



Slika 2.34. Koncentracije vitamina C u pojedinim organima (nadbubreg, pluća, jetra, slezina, pankreas) mlečne teladi (Toutain i sar., 1997)

Proučavajući uticaj načina primene vitamina C na koncentraciju askorbinske kiseline u krvnoj plazmi preživara, Black i Hidiroglou (1996) su ustanovili da je njegova aplikacija intramuskularnom injekcijom imala za rezultat veći nivo askorbinske kiseline u krvnoj plazmi u odnosu na intravensku primenu.

2.5.4.2. Nedostatak vitamina C u organizmu

Nedostatak vitamina C u organizmu dovodi do oboljenja koje se naziva skorbut. Preživari mogu da sintetišu askorbinsku kiselinu i nisu podložni nastanku simptoma trajnog nedostatka, čak ni u neonatalnom periodu, pre nego što sinteza askorbinske kiseline dostigne svoj pun kapacitet. Ipak, Cummins (1992) navodi nekoliko zapažanja o znacima nedostatka vitamina C kod teladi, među kojima su: lezije usne duplje i kože, nizak nivo askorbata u krvnoj plazmi, povećana podložnost bolestima, bolovi u mišićima i potkožna krvarenja. Kod

drugih životinjskih vrsta, nedostatak vitamina C dovodi do narušavanja procesa hemotaksije (prva faza fagocitoze) neutrofilnih granulocita i makrofaga, kao i mehanizma odbrane T-limfocita od respiratornih bolesti (Beisel, 1982; Sauberlich, 1994; Hemila i Douglas, 1999).

Smrt krava i teladi zbog skorbuta se karakteriše promenama sluzokože u usnoj duplji, njuške i kože, koje je praćeno gubitkom težine i opšte iznemoglosti (Cole i sar., 1944, Duncan, 1944). Jaka dermatozna, praćena opadanjem dlake i zadebljanjem kože, zabeležena je kod teladi koja je hranjena nedovoljnom količinom mleka. Zabeležena je i učestala pojava skorbuta i nizak sadržaj askorbinske kiseline u krvi zalučene teladi.

Na pojavu skorbuta kod zalučene teladi ukazuju i Cole i sar. (1944) u svojim istraživanjima. Stoga, MacLeod i sar. (2003) preporučuju da zamena za mleko sadrži dodatne koncentracije vitamina C u količini od 2000 mg/dan.

Proučavajući odnos između ketoze i povećanog utroška glukoze u mlečnoj žlezdi u ranom periodu laktacije krava, Padilla i sar. (2005) su ustanovili da je koncentracija glukoze u plazmi ketoznih krava bila niža nego kod kontrolnih, ali da razlike u koncentraciji vitamina C u plazmi posmatranih krava nije bilo. Rezultati ovih autora ukazuju da nivo vitamina C u krvnoj plazmi nije u korelaciji sa pojavom ketoze u ranom periodu laktacije i da organizam ketoznih krava ima sposobnost da sintetiše onu količinu vitamina C koja je dovoljna da zadovolji njihove potrebe i u uslovima smanjene koncentracije glukoze. U brojnim prethodnim istraživanjima je ustanovljeno da suplementacija vitaminom C sprečava pojavu dijareje kod teladi (Cummins i Brunner, 1989; Seifi i sar., 1996; Sahinduran i Albay, 2004).

Eicher-Pruett i sar. (1992) ukazuju na negativni efekat suplementacije vitaminom C na nivo askorbinske kiseline u neutrofilnim granulocitima, dok Cummins i Brunner (1989) nisu dokazali intenzivniju sintezu antitela nakon vakcinacije, što su pokazala i ispitivanja Hidioglou i sar. (1995).

Stres, koji je izazvan premeštanjem, bolestima, vremenskim promenama, transportom ili nekim drugim faktorima, je najverovatnije uzrok neznatnog nedostatka vitamina C kod preživara (Cummins i Brunner, 1991; Mackenzie i sar., 1997). Međutim, izvedene studije nisu do sada uspostavile jasne osnove za nivo vitamina C, koji je potreban za postizanje optimalnog zdravstvenog stanja i razvoj teladi, jagnjadi ili jarića. U skladu sa tim, dopuna

zamene za mleko sa vitaminom C u ishrani domaćih životinja do nivoa sličnih onim u punomasnom mleku se može smatrati preporučljivom.

Toplotni stres povećava proizvodnju slobodnih radikala kiseonika (Mitchell i Russo, 1983), koji mogu imati različite štetne efekte, uključujući pojavu i učestalost nekih bolesti (Lykkesfeldt i Svendsen, 2007) i reproduktivne probleme kod mlečnih krava (Miller i Brezezinska-Slebodzinska, 1993). McKee i Harrison (1995), De-Rodas i sar. (1998) i Sahin i sar. (2003) navode da suplementacija vitaminom C može uticati na oporavak u razvoju živine i odlučene prasadi, koji su izloženi toplotnom stresu.

Koncentracija vitamina C u plazmi mlečnih krava je smanjena za 50% u uslovima visokih temperatura u odnosu na kontrolisane ambijentalne uslove. Pored toga, utvrđeno je i da je koncentracija vitamina C u plazmi krava u laktaciji bila značajno niža tokom leta nego u jesen (Padilla i sar., 2006), što je potvrđeno i u istraživanjima Tanaka i sar. (2008).

Istraživanja sprovedena na bikovima ukazuju na smanjen nivo vitamina C u krvi, koji je nastao kao posledica stresa u uslovima velike hladnoće (Hidiroglou i sar., 1977). Jagos i sar. (1977) su utvrdili znatno niži sadržaj C vitamina u plazmi kod teladi sa bronhopneumonijom nego kod zdravih životinja.

Proučavajući odnos između koncentracije askorbinske kiseline i telesne težine kod teladi u velikim komercijalnim objektima, Dobsinska i sar. (1981) su ustanovili negativnu korelaciju između ova dva parametra kod teladi starosti od 2 do 22 nedelje. Utvrđen je i odnos između nedostatka vitamina C sa jedne strane, i bola u skeletnim mišićima i potkožnog krvarenja kod teladi, sa druge strane (Pribyl, 1963).

Uopšteno gledajući, promene u sadržaju askorbinske kiseline u krvnoj plazmi teladi uglavnom variraju u zavisnosti od njihovog uzrasta. Nasuprot tome, variranja u sadržaju askorbinske kiseline u plazmi jednojajčanih blizanačkih teladi tokom njihovog razvoja nema, što sugeriše da postoje jaki genetski efekti na sintezu askorbinske kiseline kod teladi (Palludan i Wegger, 1984).

Smatra se da telad starosti do četiri meseca pati od nedostatka vitamina C i da to može da utiče na smanjenu otpornost na bolesti u ranim fazama života (Wegger i Moustgaard, 1982). Miller i Kornegai (1983) nisu dokazali mikrobijalnu sintezu vitamina C u crevima.

Telad iz stada, koje karakteriše loše zdravstveno stanje, uglavnom imaju smanjen nivo askorbinske kiseline u organizmu tokom kritičnog perioda života - od rođenja do dve nedelje starosti. Itze (1984), Palludan i Wegger (1984) i Hemingway (1991) smatraju da dodavanje vitamina C u količini od 1,25 do 2,50 g dnevno utiče na smanjenje stope oboljenja respiratornih organa.

U svojim istraživanjima, Palludan i Wegger (1984) su utvrdili nizak sadržaj askorbinske kiseline u plazmi teladi starosti 10 nedelja, ali i postepeno povećanje njene koncentracije tokom kasnijeg razvića. Na osnovu ovih rezultata, isti autori ukazuju na slabu sintezu askorbinske kiseline u jetri teladi i neophodnost suplementacije vitaminom C sve dok se njihova jetra potpuno ne formira.

Sumirajući rezultate istraživanja, koji se odnose na korelaciju između uslova u kojima se domaće životinje uzgajaju i nivoa vitamina C u organizmu, Kolb (1984) je izdvojio sledeće najznačajnije faktore stresa, koji u najvećoj meri utiču na povećanje potreba za vitaminom C u cilju očuvanja optimalnog zdravstvenog stanja i telesnog razvoja:

Neadekvatna ishrana ili neadekvatno konzumiranje kolostruma;

Izloženost enteričnim i respiratornim bolestima;

Kastracija, vakcinacija;

Odbijanje od dojenja, premeštaj iz individualnog u grupni smeštaj;

Stres zbog transporta;

Paraziti;

Nagle i ekstremne promene vremenskih uslova.

Pod ovim uslovima, suplementacija sa 1 do 2 g vitamina C dnevno se smatra korisnom. Kod mlade teladi, kojoj je u ishrani dodavan vitamin C, je primećeno poboljšano zdravlje, koje se ogleda u smanjenju pojave disajnih infekcija, peritonitisa, pneumonije, enteritisa i mortaliteta (Cummins i Brunner, 1989; McDowell, 2000).

Na osnovu prethodno navedenih istraživanja, može se konstatovati da su mladi preživari osetljivi na nedostatak vitamina C u toku prvih nekoliko nedelja života, naročito u uslovima stresa, kao i kada su izloženi bolestima ili ograničenoj ishrani kolostrumom. Takođe

se smatra da vitamin C nije esencijalan dijetalni dodatak u ishrani odraslih preživara, ali je njihovo zdravstveno stanje poboljšano kada im se vitamin C dodaje u hrani u uslovima stresa ili bolesti kao što je mastitis.

2.5.4.3. Potencijalna toksičnost vitamina C u organizmu

Uopšteno gledajući, vitamin C nije toksičan za organizam. Oralno se askorbinska kiselina može davati većini laboratorijskih životinja u dozama od nekoliko grama po kilogramu telesne težine bez ikakvog negativnog efekta na zdravlje (NRC, 1987). Isto tako, ne postoje dostupni podaci o toksičnosti vitamina C kod preživara. Sa druge strane, Leeson i Summers (2001) navode da se toksičnost vitamina C može sagledati kroz ometanje oksidativnog sistema u jetri, pri čemu je jedan od tih znakova može povećana akumulacija gvožđa u jetri.

2.5.5. Pregled ispitivanja uloge vitamina C u imunitetu organizma domaćih životinja

Vitamin C može indirektno poboljšati imuni odgovor organizma, omogućavajući održavanje nivoa vitamina E u tkivima. Stoga je potreban za rast i oporavak tkiva u svim delovima tela.

Pregled rezultata, koji se odnose na naučna istraživanja iz oblasti proučavanja uloge vitamina C u imunitetu domaćih životinja, se može sagledati kroz ocenu antioksidativne sposobnosti i nivoa askorbinske kiseline u neutrofilnim granulocitima krvi, kao najbrojnijoj vrsti leukocita, koji, uglavnom, predstavljaju prvi odgovor imunog sistema organizma na infekciju (Anderson i sar., 1990; Bendich, 1989, 1992; Beisel, 1982; Gerber, 1975; Goldschmidt, 1991; Nagórna-Stasiak i sar., 1997; Naresh i sar., 2003; Padayatty i sar., 2003; Politis i sar., 1995; Ramanathan i sar., 2002; Roth i Kaeberle, 1985; Wróbel i sar., 2003).

Fiziološke posledice supkliničkog nedostatka askorbinske kiseline mogu biti multifaktorijalne, te je optimalan nivo askorbinske kiseline u organizmu od presudne važnosti za efektivnost imunog sistema (Bendich, 1989, 1992).

Patogeni organizmi, kao što su bakterije i virusi, mogu prouzrokovati nastanak slobodnih radikala u zaraženom domaćinu, pa samim tim utiču na opadanje nivoa askorbinske kiseline i slabljenje imunih funkcija (Beisel, 1982). Shodno tome, optimalan nivo askorbinske kiseline i drugih antioksidativnih vitamina, kao što je vitamin E, utiče na

značajno smanjenje štetnog dejstva slobodnih radikala i poboljšanje funkcije neutrofilnih granulocita kao primarnih leukocita, koji su odgovorni za inhibiciju invazivnih patogena (Politis i sar., 1995). Procena antioksidativne aktivnosti askorbinske kiseline u krvi krava se može sprovesti merenjem direktnog i indirektnog antioksidativnog metaboličkog koeficijenta.

Sposobnost askorbinske kiseline da umanja štetan uticaj životne sredine na metabolizam je od posebnog interesa (Nagórna-Stasiak i sar., 1997; Naresh i sar., 2003). Smatra se da ona štiti DNK ćelija od oštećenja slobodnim radikalima, sprečava infekcije jačanjem ćelijske membrane i pomaže u zaštiti fagocitnih ćelija od oksidativnog oštećenja. U njenom prisustvu, hemoliza eritrocita u krvi goveda je značajno niža (Wróbel i sar., 2003). Utvrđeno je i da su pojedini antioksidansi, uključujući vitamin C, u stanju da spreče oštećenja leukocita u različitom stepenu. Tako se smatra da je zaštita askorbinskom kiselinom 41%, zaštita α -tokoferolom 55%, a β -karotenom 50% (Ramanathan i sar., 2002).

Nedostatak askorbinske kiseline može uticati na smanjenje sposobnosti ćelija da migriraju na mesto inflamacije, omogućavajući povećano oksidativno oštećenje neutrofilnih granulocita i smanjenu sintezu glavnog antimikrobnog agensa - hipohlorne kiseline, što se odražava i kroz negativan uticaj na proliferaciju limfocita. U prisustvu optimalnog nivoa askorbinske kiseline, proliferacija limfocita se odvija normalno (Anderson i sar., 1990), a stimuliše se i proizvodnja interferona (Gerber, 1975).

Neutrofilni granulociti sadrže oko 40-60 puta veću koncentraciju vitamina C nego krvna plazma. Smatra se da su pokretljivost i fagocitni kapacitet neutrofilnih granulocita poboljšani nakon suplementacije vitaminom C (Roth i Kaeberle, 1985).

Nivo askorbinske kiseline je visok u zrelih neutrofilni granulocitima periferne krvi (Padayatty i sar., 2003). Međutim, načini delovanja askorbata na metabolizam i funkciju neutrofilnih granulocita su još uvek nejasni, iako je utvrđeno da on utiče na hemotaksiju i fagocitozu (Goldschmidt, 1991).

2.5.6. Pregled ispitivanja uticaja nivoa vitamina C u krvi i mleku krava sa mastitisom

Imuni sistem, kao i bilo koji drugi fiziološki sistem, ne funkcioniše optimalno tokom perioda neuhranjenosti. Pored toga, imuni sistem ima visoke zahteve za određenim hranljivim materijama i antioksidantima, kao što su vitamini. Kada ovi sastojci nisu dati u odgovarajućim količinama, imuni sistem može biti hipofunkcionalan. Kod mlečnih krava,

ovo stanje se često dešava u slučajevima mastitisa, koji predstavlja upalno oboljenje mlečne žlezde i mlečnih kanala i od velikog je ekonomskog značaja, s obzirom da može dovesti do promene kvaliteta i smanjenog obima proizvodnje mleka.

Askorbinska kiselina je najzastupljeniji i najvažniji vodorastvorljivi antioksidans sisara (Sauberlich, 1994), iako se osim kod primata i zamorčica može sintetisati u organizmu najvećeg broja sisara. Ona nije esencijalni nutritijent za mlečne krave iako rezultati brojnih istraživanja potvrđuju jasnu vezu između nivoa askorbinske kiseline u krvnoj plazmi i mleku s jedne strane, i pojave mastitisa s druge strane, kao i između pravilne dopunske ishrane i terapije vitaminom C s jedne strane, i učestalosti pojave i ozbiljnosti mastitisa s druge strane (Batra i sar., 1992; Chaiyotwittayakun i sar., 2002; Chew i sar., 1982; Craven i Williams, 1985; Craven, 1987; Erskine i sar., 1987; Erskine i sar., 1989; Hogan i sar., 1992; Kleczkowski i sar., 2005; Kucmyj, 1955; Musal i sar., 2007; Naresh i sar., 2002; Ndiweni i sar., 1991; Padilla i sar., 2006; Radostits i sar., 1994; Reineke i sar. 1940; Ranjan i sar., 2005; Roth i Kaeberle, 1985; von Wendt, 1938; van Merris i sar., 2004; Weiss i sar., 2004; Weiss i Hogan, 2007).

U istraživanjima Kucmyj-a (1955) i Chaiyotwittayakun-a i sar. (2002) utvrđeni su pozitivni efekti suplementacije vitaminom C na prinos i kvalitet mleka krava. Iako organizam krava može da sintetiše vitamin C i on nije neophodan kao dodatak u ishrani muznih krava, postoje podaci koji ukazuju na izraženo smanjenje sadržaja vitamina C u plazmi krava u laktaciji, kod kojih su zabeleženi simptomi mastitisa (Weiss i sar., 2004; Kleczkowski i sar., 2005), kao i kod onih, koje su doživele toplotni stres (Padilla i sar., 2006).

Ozbiljnost kliničkih znakova mastitisa je u korelaciji sa stepenom smanjenja koncentracije vitamina C u plazmi (Weiss i sar., 2004), te je u istraživanjima Chaiyotwittayakun i sar. (2002) i Weiss i Hogan (2007) utvrđeno da je dodatak vitamina C u ishrani mlečnih krava stimulisao oporavak od akutne upale vimena sa smanjenim brojem somatskih ćelija.

Trajanje kliničkog mastitisa, visoke telesne temperature, broj formiranih kolonija bakterije *E. coli* izolovanih iz zaražene žlezde i gubitak u prinosu mleka su u korelaciji sa promenom koncentracije vitamina C u mleku u posmatranom godišnjem kvartalu (Weiss i sar., 2004).

Efikasnost parenteralne terapije vitaminom C kao potencijalnim tretmanom mastitisa ispitivali su: Chaiyotwittayakun i sar., 2002; Naresh i sar., 2002 i Weiss i Hogan, 2007. Tako su Chaiyotwittayakun i sar. (2002) utvrdili da je tretman askorbinskom kiselinom intravenoznom injekcijom dva puta u roku od 8 časova u količini od 25 g uticao na smanjenje jačine akutne upale vimena, koja je prethodno indukovana intramamarnom infuzijom endotoksina. Drugi eksperiment koji su izveli Naresh i sar. (2002) je ukazao da je primena askorbinske kiseline potkožnom injekcijom u koncentraciji od 25 mg/kg telesne mase stimulisala oporavak od kliničkog mastitisa kod krava tretiranih antibioticima. Isto tako, Weiss i Hogan (2007) su utvrdili da dodatak vitamina C u obliku askorbil-2-polifosfata u količini od 30 g/dan utiče na smanjenje broja somatskih ćelija u mleku krava sa mastitisom, koji je indukovano infuzijom endotoksina, ali da nije poboljšao funkciju neutrofilnih granulocita u krvi. Stoga se može konstatovati da suplementacija vitaminom C može povećati oporavak od mastitisa ili ublažiti njegove posledice kod krava u laktaciji sa niskom koncentracijom askorbinske kiseline u krvnoj plazmi.

Procenom meliorativnog potencijala L-askorbinske kiseline u intramamarnoj antibiotskoj terapiji u okviru konvencionalog uzgajanja goveda sa kliničkim mastitisom bavili su se Ranjan i sar. (2005). Ovi autori su proučavali uporednu terapiju antibioticima i terapiju antibioticima i L-askorbinskom kiselinom u lečenju kliničkog i supkliničkog mastitisa kod četiri stada sa 225-250 krava u laktaciji. Oni su ustanovili veću stopu oporavka kod krava, koje su primile dvojnu terapiju antibioticima i L-askorbinskom kiselinom, nego kod onih, koje su lečene samo antibioticima. Takođe su utvrdili da su prosečne potrebe za antibiotskom terapijom bile manje kod krava, koje su tretirane dvojnou terapijom. Na osnovu dobijenih rezultata, ovi autori su konstatovali da L-askorbinska kiselina ima meliorativni potencijal u terapiji goveda sa kliničkim mastitisom i da se može koristiti uz intramamarnu antibiotsku terapiju u cilju povećanja stope izlečenja.

Kleczkowski i sar. (2005) su sproveli istraživanje na 56 krava, raspoređenih u pet grupa, od kojih je četiri bilo sa kliničkim formama mastitisa izazvanog bakterijama *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* i *Escherichia coli*, peta je bila kontrolna grupa. Ovi autorii utvrdili su značajno nižu koncentraciju askorbata u serumu krava sa mastitisom (29,4 $\mu\text{mol/L}$) u poređenju sa kontrolnom grupom (64,9 $\mu\text{mol/L}$).

Von Wendt (1938) je u svojim istraživanjima utvrdio da sadržaj askorbinske kiseline u mleku zavisi od zdravstvenog stanja vimena. On navodi da, ukoliko se jedna četvrtina vimena inficira, sadržaj askorbinske kiseline u mleku iz nje brzo opada i može pasti skoro na nulu. Ako su zaražene sve četiri četvrtine, mešovito mleko u njima može biti gotovo potpuno bez askorbinske kiseline. Slično ovim rezultatima, Reineke i sar. (1940) su u svojim istraživanjima sprovedi studiju u cilju određivanja odnosa između infekcije u pojedinačnim četvrtima vimena krava i nivoa vitamina C i hlorida u mleku. Oni su utvrdili da infekcija vimena utiče na smanjenje koncentracije askorbinske kiseline u mleku u sve četiri četvrti vimena, pri čemu je stepen smanjenja u korelaciji sa intenzitetom infekcije. Takođe su ustanovili da je koncentracija askorbinske kiseline u mleku za oko 10% smanjena u ranim fazama mastitisa, dok je u kasnijim fazama smanjena za čak 30 do 50%.

Neutrofilni granulociti su primarni odbrambeni mehanizam domaćina pri pojavi mastitisa i njihova reakcija zavisi od učestalosti i intenziteta mastitisa kod mlečnih krava (Craven i Williams, 1985). Shodno tome, cilj eksperimenta Weiss-a i sar. (2004) je bio da se utvrdi da li je na status vitamina C kod mlečnih krava uticala pojava akutnog koliformnog mastitisa. Ovi autori su merili koncentraciju askorbinske kiseline i dehidro-L-askorbinske kiseline u krvnoj plazmi kod 21 grla krave rase holštajn pre i nakon intramamarnе infuzije bakterije *Escherichia coli*. Utvrdili su smanjenje koncentracije vitamina C (askorbinska kiselina + dehidro-L-askorbinska kiselina) u krvnoj plazmi za 39%, i koncentraciju vitamina C i askorbinske kiseline u mleku za 52%, odnosno, 62%, u uzorcima uzetim nakon 24 h od zaražavanja sa *E. coli*. Na osnovu dobijenih rezultata, autori su konstatovali da su trajanje kliničkog mastitisa, visoka telesna temperatura, broj formiranih kolonija *E. coli* izolovanih iz zaraženih mlečnih žlezdi, kao i gubitak u prinosu mleka, povezani sa promenom koncentracije vitamina C u mleku u tretiranoj grupi krava. Izraženo smanjenje ove koncentracije u mleku je u korelaciji sa stepenom ozbiljnosti kliničkih znakova mastitisa. Ustanovljena je i korelacija između nivoa vitamina C u krvnoj plazmi i izraženosti kliničkih znakova mastitisa, ali ona nije bila statistički značajna.

Weiss i Hogan (2007) navode da su koncentracije vitamina C u neutrofilnim granulocitima izolovanim iz mleka oko tri puta veće od koncentracije ovog vitamina u krvnim neutrofilnim granulocitima.

Smatra se da antioksidansi povećavaju sposobnost odbrambenog mehanizma neutrofilnih granulocita i ostalih imunskih funkcija tokom kliničkog i supkliničkog mastitisa (Hogan i sar., 1992; van Merris i sar., 2004). Tako, mnoga istraživanja potvrđuju saznanja o pozitivnim efektima antioksidanasa (vitamini A, C, E, selen i β -karoten) na pojavu i trajanje infekcije, na osnovu merenja njihovog sadržaja u krvi i mleku krava sa kliničkim i supkliničkim znacima mastitisa (Batra i sar., 1992; Chew i sar., 1982; Erskine i sar., 1989; Erskine i sar., 1987; Kleczkowski i sar., 2005; Ndiweni i sar., 1991). U skladu sa tim, Musal i sar. (2007) su proučavali nivo antioksidanasa u krvi, uključujući vitamin A i C, β -karoten, glutation i ceruloplazmin, kao i oksidativnih stres markera (malondialdehid) kod holštajn-frizijske rase krava sa supkliničkim mastitisom. Njihovi rezultati ukazuju da supklinički mastitis značajno menja antioksidativnu sposobnost u plazmi krava i da efikasni intramamarni tretman delimično obnavlja antioksidativni status i koncentraciju vitamina C u krvi.

Prema Radostits i sar. (1994), visoko-mlečne krave su veoma sklone hipoglikemiji ili tokom poslednjih faza graviditeta, ili na vrhuncu laktacije. Roth i Kaeberle (1985) ukazuju na zanimljive nalaze u vezi sa askorbinskom kiselinom kod goveda. Ovi autori, između ostalog, navode da je terapija mastitisa, dopunjena vitaminom C, znatno uvećala destrukciju bakterije *Staphylococcus aureus* u neutrofilnim granulocitima goveda.

Craven (1987) je analizirao interakciju antibiotika, bakterija i različitih komponenti imunog sistema i ustanovio da je stopa oporavka od supkliničkog mastitisa visoka zahvaljujući imunostimulativnim efektima askorbinske kiseline na funkciju mlečnih neutrofilnih granulocita. U skladu sa tim on ukazuje na spontani oporavak vimena od infekcije u uslovima stimulacije odbrambenih mehanizama vitaminom C. Calsamiglia i Rodriguez (2012) smatraju da vitamin C potpomaže terapiju mastitisa stimulacijom funkcija neutrofilnih granulocita.

2.5.7. Pregled ispitivanja oksidativnog praska i uloge vitamina C u oksidativnom prasku

Glavni korak u fagocitozi, kao jednoj od osnovnih faza inflamacije ili zapaljenja, je uništavanje i razlaganje bakterija, koje uzrokuju ovo stanje. Brojni enzimi razaraju pojedine strukture mikroorganizama, ali nisu glavni agensi koji dovode do njihove smrti. Tu ulogu imaju slobodni radikali kiseonika, koji se generišu u oksidativnom prasku (engl. *respiratory/oxidative burst*), ili lizozim.

2.5.7.1. Pojam oksidativnog praska

Oksidativni (respiratorni) prasak podrazumeva oslobađanje reaktivnih radikala kiseonika (radikalni superoksid i vodonik peroksid) iz različitih tipova ćelija. (http://en.wikipedia.org/wiki/Respiratory_burst). Ova funkcionalna reakcija doprinosi odbrambenom mehanizmu domaćina, ali takođe može dovesti i do kolateralnog oštećenja tkiva domaćina (Chen i Junger, 2012).

Među elementima odbrambenog mehanizma domaćina protiv mikrobnih patogena, neutrofilni granulociti imaju veoma značajnu ulogu. Iako neutrofilni granulociti sintetišu i oslobađaju čitav niz toksičnih agenasa usmerenih ka ubijanju i razlaganju patogenih mikroorganizama, sistemi koji zavise od reaktivnih produkata metabolizma kiseonika, su posebno potentni. ROS nastaju kao posledica respiratornog praska, odnosno, niza procesa, koji se iniciraju fagocitozom ili delovanjem pojedinih proinflamatornih medijatora. Ovo stanje karakteriše dramatično povećanje oksidativnog metabolizma, uz direktnu konverziju molekularnog kiseonika u njegov univalentni redukovani oblik - superoksid anjon (O_2^-) (Clark, 1999).

Neutrofilni granulociti i monociti, kao glavne proinflamatorne ćelije, u toku fagocitoze, mogu da izbace sadržaj granula u okolno tkivo. To se događa ako fagocitna vakuola ostane prolazno otvorena pre kompletnog zatvaranja fagolizozoma. U slučaju kada se imuni kompleksi talože na ravnim površinama (bazalna membrana glomerula) ne dolazi do fagocitoze, već se lizosomalni enzimi oslobađaju u medijum (frustrirana fagocitoza). Ponekada, specifične granule neutrofilnih granulocita mogu da isprazne svoj sadržaj egzocitozom. Nekonrolisano oslobađanje velike količine enzima uz istovremeno generisanje proinflamatornih medijatora iz aktiviranih leukocita može da ošteti ćelije i razori ekstraćelijski matriks.

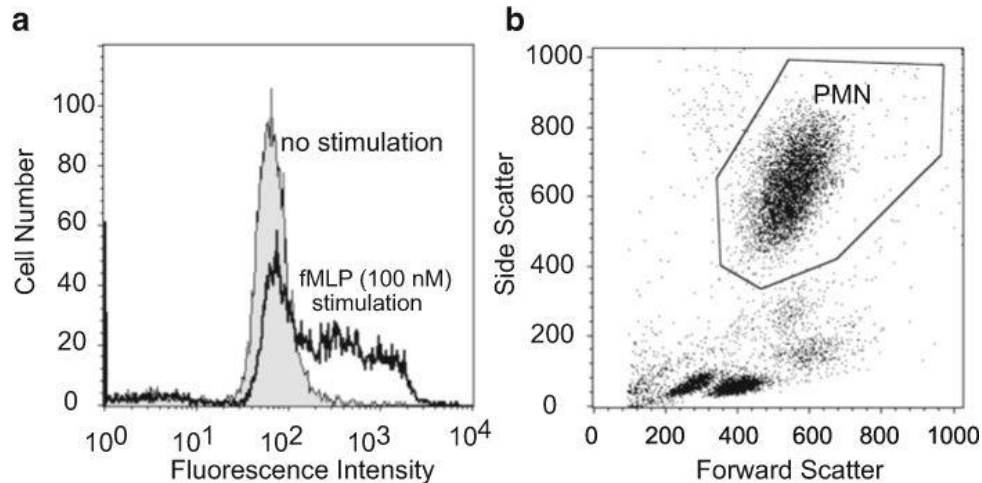
Mehanizmi koje poseduju leukociti služe da otklone prouzrokovaoče zapaljenja i lokalizuju proces. Ukoliko su ti procesi nekontrolisani, mogu ozbiljno da oštete tkiva i pogoršaju inflamaciju.

Aktiviranjem leukocita, aktivira se i membranska NADPH oksidaza, složen multienzimski sistem, koji stvara visoko reaktivne metabolite kiseonika, superoksid jon O_2^- , koji spontanom dismutacijom prelazi u vodonik peroksid (H_2O_2) i OH radikal. Slobodni

radikali kiseonika vrše peroksidaciju proteina i lipida membrana, dovodeći do njihovog oštećenja, čime se objašnjava baktericidno dejstvo. U lizozomima leukocita se nalazi i mijeloperoksidaza, koja stupa u reakciju sa H_2O_2 i hloridnim jonima i stvara jak oksidans, hipohlornu kiselinu, koja uništava bakterije halogenacijom (vezivanje Cl za ćelijske molekule) ili peroksidacijom lipida i proteina. Stoga je očigledno da navedene komponente lizozoma imaju brojna dejstva, koja bi u slučaju da nisu kontrolisana, dovele do jakog oštećenja tkiva.

Nesporno je da slobodni radikali pomažu adaptaciju i oporavak tkiva posle oštećenja na više načina. Naime, oni podstiču oštećene ćelije da uđu u programiranu ćelijsku smrt – apoptozu (Kim i sar., 2001; Stevanović i sar., 2002; Radovanović i sar., 2004), a takođe indukuju i privlačenje leukocita u oštećeno tkivo, aktiviraju ih i značajno učestvuju u njihovoj fagocitnoj ulozi. Na taj način, slobodni radikali potpomažu uklanjanje oštećenih ćelija iz tkiva i tako ubrzavaju njihov oporavak. Ako tome dodamo i ulogu slobodnih radikala u podsticaju sinteze nekih biološki aktivnih jedinjenja (npr. NO, kao vazodilatatornog i angiogenog transmitera) i stimulaciji normalnog rasta ćelija, jasno je da su oni uključeni u kompletan tok oporavka tkiva, od uklanjanja oštećenih ćelija do njihove zamene novim. Međutim, ovde se mora istaći da, osim u uklanjanju oštećenih ćelija, slobodni radikali učestvuju i u ćelijskom starenju (Stevanović i sar., 2011).

Među različitim razvijenim metodama merenja oksidativnog praska u neutrofilnim granulocitima, dve metode se posebno široko koriste zbog njihove praktičnosti i tačnosti. Prvi metod zavisi od redukcije citohroma c, što se može oceniti fotometrijom, dok se drugi postupak oslanja na promene u osobinama fluorescencije dihidrorodamina 123, što se procenjuje protočnom citometrijom (slika 2.35) (Chen i Junger, 2012).



Slika 2.35. Merenje oksidativnog praska protočnom citometrijom: primer histograma pre i 10 min posle stimulacije neutrofilnih granulocita (Chen i Junger, 2012)

2.5.7.2. Uloga vitamina C u oksidativnom prasku

Oksidativni stres se kod domaćih životinja može zaustaviti odbrambenim aktivnostima antioksidativnih sistema, koji se sastoji od inhibirajućih aktiviranih molekula antioksidanasa. Tako se smatra da je askorbinska kiselina jedan od najvažnijih antioksidanasa u tom procesu, pri čemu je vrlo malo istraživanja o ulozi vitamina C ili askorbinske kiseline u oksidativnom prasku (Audera i sar., 2001; Erb i sar., 2004).

Nakon stimulacije neutrofilnih granulocita, pod uticajem bakterija ili nekih hemijskih stimulansa, oslobađaju se slobodni radikali kiseonika, što se vezuje za početak respiratornog praska. Nadalje, utvrđeno je da askorbinska kiselina utiče na povećanje aktivnosti heksoza monofosfata u statičnim i stimulisanim neutrofilnim granulocitima, što dovodi do sinteze NADPH (DeChatelet i sar., 1972).

Pojedini autori, između ostalog, navode da porast nivoa unutarćelijske askorbinske kiseline nastaje u trenutku kada je ćeliji potrebna maksimalna antioksidativna zaštita od produkata oksidativnog praska, kao njene sopstvene reakcije (Zempleni i sar., 2007), odnosno, od oksidanasa, koji se sintetišu u ovom procesu (Weiss i sar., 2004). Shodno tome, Washko i sar. (1993) su ustanovili da se unutarćelijska koncentracija askorbinske kiseline značajno povećava kada se neutrofilni granulociti krvi aktiviraju, verovatno da bi da se ćelije i okolna tkiva zaštitili od oštećenja, koja su uzrokovana slobodnim radikalima kiseonika,

generisanim u oksidativnom prasku. Ovo može biti jedno od objašnjenja za vezu između vitamina C i pojave mastitisa.

Kao imunomodulator, askorbat ima ulogu kao ćelijski medijator, ali i u imunskom odgovoru životinjskog organizma. Prema Harris-u (1996), ova uloga uključuje povećanje adhezije neutrofilnih granulocita, hemotaksije i respiratornog praska, regulisanja antigen-indukovane proliferacije limfocita i citokinske funkcije, smanjenje stepena osetljivosti organizma, kao i povećanje intenziteta formiranja antitela i interferona. Stoga je neophodno da se u leukocitima održava optimalni nivo koncentracije askorbata kako bi se obezbedila adekvatna antioksidativna zaštita.

Može se konstatovati da vitamin C, iako odavno otkriven, ostaje zanimljiva i nedovoljno istražena tema mnogih naučnih istraživanja, koja se odnose na njegovu ulogu u oksidativnom prasku (Harris, 1996; Kleczkowski i sar., 2005).

2.6. Protočna citometrija (*flow cytometry*) u analizi funkcija neutrofilnih granulocita

Protočna citometrija se danas smatra modernom tehnološkom metodom koja je danas dragocena za rad velikog broja veterinarskih kliničkih i naučnih laboratorija (Perkins i sar., 1996). Tehnologija protočne citometrije je inkorporirana u savremene hematološke analizatore i omogućila je precizniju evaluaciju veličine eritrocita (RBC), količine hemoglobina, automatsko određivanje diferencijalnog broja leukocita i određivanje određenog broja parametara trombocita uključujući i detekciju aktivnih trombocita. Instrumenti protočne citometrije se mogu prilagoditi analizama velikog broja ćelija i čestica ukoliko je moguće napraviti jednoćelijsku suspenziju i ukoliko su dostupna specifična monoklonska antitela ili specifična citofluorescentna boja za tu vrstu uzorka.

Protočna citometrija se definiše kao tehnologija koja meri mnogostruke karakteristike ćelija ili čestica dok prolaze kroz izvor svetlosti. Osim ćelija, protočnom citometrijom se mogu detektovati hromozomi, proteini ili molekuli koji su vezani za čestice. Sorter aktivisanih fluorescentnih čestica (engl. *fluorescent activated cell sorter*, FACS) je protočni citometar koji ima mogućnost razdvajanja fluorescentnih obeleženih čestica u mešanoj ćelijskoj populaciji. Najveći broj laboratorijskih protočnih citometara nema sposobnost sortiranja ćelija već imaju specifičnu namenu merenja rasipanja i emitovanja fluorescentne svetlosti (Coon i sar., 1987).

Veliki broj testova protočne citometrije se koristi za analize funkcija neutrofilnih granulocita. Ovi testovi uključuju oksidativni metabolizam, fagocitozu, degranulaciju, aktivacione markere, ekspresiju sadržaja izlučenih granula, promene oblika, sadržaj F aktina i opsonizaciju.

Druge opisane metode u merenju funkcije neutrofilnih granulocita, kao što su fizičke, mikroskopske ili hemijske su komplikovane, potrebno je dosta vremena za njihovo izvođenje i čitav panel testova radi analize određene funkcije neutrofilnih granulocita. Takav je recimo slučaj sa analizom fagocitoze, koja je multisekvencionalan proces i podrazumeva više faza u radu. Ovakvi testovi zahtevaju i veliki broj neutrofilnih granulocita za analizu.

Analiza funkcija neutrofilnih granulocita protočnom citometrijom ima značajne prednosti u odnosu na klasične metode. Protočna citometrija se može veoma brzo obaviti, zahteva mali broj ćelija u uzorku (50-100 puta manje nego konvencionalne metode) i može biti primenjena na heterogenu populaciju ćelija kao što je to slučaj sa punom krvi. Analizom pune krvi se izbegava nenamerna aktivacija neutrofilnih granulocita koja je čest slučaj kod izolacije neutrofilnih granulocita primenom klasičnih metoda.

Opisan je veliki broj testova funkcije neutrofilnih granulocita metodom protočne citometrije medicine u humanoj medicini (van Eeden i sar., 1999), dok je taj broj u veterinarskoj medicini relativno mali.

Metode analize fagocitne funkcije neutrofilnih granulocita koriste punu krv koja se prvo inkubira sa česticama konjugovanim fluorescentnom bojom (najčešće čestice lateksa, bakterije ili kvasci). Kvantitet fluorescencije koja se detektuje u neutrofilnim granulocitima je indikator fagocitne aktivnosti. U analizi se koristi heparin kao antikoagulans zbog toga što drugi antikoagulansi stvaraju helate sa dvovalentnim jonima kalcijuma (Ca^{++}). Do skoro je ograničenje ove tehnike bila nespecifična adherencija fluorescentnih čestica na membranu neutrofilnih granulocita bez njihove fagocitoze čime su nastajali lažni rezultati o visokom nivou fagocitoze. Upotreba boja kao što su tripan plavo ili kristal violet omogućila je gašenje fluorescencije nefagocitovanih čestica na površini membrane neutrofilnih granulocita i sprečavanje lažnog prikaza fagocitoze. Međutim, upotreba ovih boja pomalo usporava i komplikuje sam postupak pripreme uzoraka jer zahteva upotrebu fiksativa i dva ispiranja viška boje, što odlaže analizu na protočnoj citometriji (Milovanović, 2014). Osim toga

moguće je i kontrolni uzorak inkubirati na 4°C čime se sprečava fagocitoza i omogućava kvantifikacija nespecifične adhezije.

Do sada je razvijen veliki broj testova koji mogu mjeriti stvaranje reaktivnih kiseonikovih vrsta (ROS) od kojih je najčešće korišćena zelena fluorescentna boja 2,7 dihlorofluorescein (DCF). Acetatna forma boje ulazi u ćeliju u kojoj biva oksidovana od strane vodonik peroksida čime se stvara karakteristična zelena fluorescencija. Slična tehnika koristi boju dihidrorodamin 123 koja se u neutrofilni granulocitima konvertuje u rodamin 123. Lažni rezultati ovom tehnikom mogu biti dobijeni kod životinja sa hipereozinofilijom zbog sposobnosti eozinofilnih granulocita da produkuju ROS.

Smits i saradnici (1997) opisuju jednu varijantu metode protočne citometrije koja omogućava simultanu evaluaciju fagocitoze i oksidativnog praska neutrofilnih granulocita u krvi krava. Slična metoda korišćena je kasnije i kod neutrofilnih granulocita pasa, mačaka i konja. Ovom metodom se istovremeno detektuje produkcija ROS korišćenjem zelenih fluorescentnih boja (2,7 dihlorofluoresceina i dihidrorodamina 123) uz istovremenu detekciju ingestije bakterija konjugovanih propidijumbromidom koje emituju crvenu svetlost. U skorije vreme je dostupan i komercijalni test za protočnu citometriju koji simultano detektuje i fagocitozu i oksidativni prasak neutrofilnih granulocita goveda (Kampen i sar., 2004).

3. CILJEVI I ZADACI ISPITIVANJA

Na osnovu podataka iz literature i sopstvenih preliminarnih rezultata, definisani su sledeći osnovni ciljevi ovih istraživanja:

1. Utvrđivanje stepena funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita u punoj krvi i mleku visokomlečnih krava koje su imale pozitivnu CMT reakciju (engl. *California Mastitis Test*) (++, +++) u periodu od 10 do 30 dana posle teljenja, kod svih grla uključenih u ogled.
2. Utvrđivanje stepena funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita u krvi i mleku svih grla u eksperimentu nakon završene terapije injekcionim preparatom C vitamina u trajanju od 5 dana.
3. Poređenje vrednosti ispitivanih parametara registrovanih u tretiranoj i kontrolnoj grupi krava i određivanje stepena statističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima.
4. Utvrđivanje razlika u zastupljenosti pojedinih vrsta bakterija i broju somatskih ćelija u mleku krava pre i posle sprovedene terapije.

Za realizaciju navedenih ciljeva istraživanja postavljeni su sledeći istraživački zadaci:

1. Tretman grupe od 30 krava injekcionim preparatom vitamina C supkutano i kontrolne grupe od 10 krava, na isti način i u istoj količini sterilnim fiziološkim rastvorom.
2. Ispitivanje hematološkog profila svih krava uključenih u ogled na početku i na kraju terapije.

3. Ispitivanje funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita (intenzitet fagocitoze i respiratorni prasak) krava tretirane i kontrolne grupe u krvi i mleku, na početku i na kraju terapije.

4. Mikrobiološka analiza uzoraka mleka svih grla uključenih u ogled i određivanje broja somatskih ćelija na početku i na kraju terapije.

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1 Ogladne životinje

4.1.1. Opšti podaci

Istraživanja sprovedena u okviru ove doktorske disertacije su izvršena na komercijalnoj farmi visokomlečnih krava holštajn-frizijske rase u okolini Beograda, u periodu septembar-oktobar 2013. godine. Farma je raspolagala sa oko 1000 krava na muži, u vezanom sistemu držanja tokom trajanja laktacije. Muža je obavljana dvokratno, u samom objektu. Prosečna mlečnost na ovoj farmi je iznosila oko 8.000 litara, obračunato na laktaciju od 305 dana. Prosečan sadržaj proteina u mleku je iznosio oko 3,2% a mlečne masti oko 3,5%.

Ishrana je bila zasnovana na kompletno izmešanom obroku koji je dostavljan dvokratno (jutarnji i večernji obrok pre muže). Objekti za smeštaj krava su bili zatvorenog tipa, kapaciteta 120 grla.

Higijena mlečne žlezde je sprovedena na sledeći način: suvim pranjem oksipenom pre muže i potapanjem papila u Blu-gard (Ecolab Inc., USA) posle muže, preparatom na bazi dodecil-benzensulfonske kiseline. Muža je vršena dva puta dnevno muznim aparatima DeLaval koji omogućavaju individualno programiranu kontrolu muže, sa prilagođavanjem trajanja muže svake životinje i merenjem količine izmuženog mleka od pojedinačnih krava. Dezinfekcija muznih aparata i sistema za mužu je obavljana svakodnevno, postupajući prema instrukcijama proizvođača (naizmeničnom upotrebom baznih i kiselih preparata).

4.1.2. Selekcija oglednih grla

Za izvođenje eksperimenta odabrano je ukupno 40 krava holštajn-frizijske rase, sličnog pariteta i starosti.

Selekcija grla je obavljena na osnovu sledećih kriterijuma:

1. da je od teljenja prošlo najmanje 10, a najviše 30 dana;

2. da su na jutarnjoj muži krave imale pozitivnu reakciju na CMT (odabrana su samo grla sa ++ i +++ pozitivnom reakcijom) u jednoj ili više četvrti, bez klinički vidljivog mastitisa;
3. da je teljenje prošlo normalno, bez dodatne asistencije akušera;
4. da su krave bile klinički zdrave.

Ukupno je 40 krava holštajn-frizijske rase bilo podeljeno u dve grupe:

- 1) Tretirana grupa, (n=30) koja je supkutano dobijala injekcioni preparat vitamina C („Vitamin C“, VZ Subotica, R. Srbija) odmah po završetku jutarnje muže, jednom dnevno, u periodu od 5 uzastopnih dana, u isto vreme, na isti način (supkutano) i u istoj ukupnoj količini (po 125 ml);
- 2) Kontrolna grupa, (n=10), koja je supkutano dobijala sterilni fiziološki rastvor (*Sol. Natrii chloridi infundibile* 0.9%, Hemofarm AD, Vršac, R. Srbija) u istoj količini i na isti način kao i grla ogledne grupe.

U cilju što kvalitetnije organizacije i sprovođenja predviđenih koraka, ukupno je 40 odabranih grla bilo podeljeno u 4 grupe od po 10 krava. Eksperimentalni ciklus je trajao ukupno 11 dana i ponavljan je 4 puta, sa po 10 grla u kalendarskim razmacima od po 2 nedelje u periodu septembar-oktobar 2013.godine.

Prve tri grupe (30 grla) su činile krave koje su bile tretirane C vitaminom tokom 5 dana, dok je četvrta (poslednja) grupa predstavljala kontrolnu grupu, koja je primala samo fiziološki rastvor.

4.2. Faze eksperimenta

Eksperimentalni ciklus je trajao 11 dana i organizaciono je bio podeljen na dva dela:

I deo (pripremna faza) Ova faza je trajala od prvog do četvrtog dana eksperimenta i obuhvatala je selekciju i pripremu grla koja će ući u eksperiment.

U okviru prvog dela ogleda su obavljani sledeći koraci:

1. **Prvi dan** eksperimenta (petak) - Trijaža grla koja će ući u eksperiment je sprovedena na osnovu CM testa na jutarnjoj muži krava, gde su se sva grla nalazila u periodu od

najmanje 10 do maksimalno 30 dana posle teljenja. Od grla koja su pozitivno reagovala (++, +++) odmah su uzimani uzorci mleka na propisan način iz svake četvrti sa pozitivnom reakcijom, pojedinačno u sterilne epruvete radi dalje mikrobiološke analize (bakteriološka izolacija i tipizacija).

2. **Četvrti dan** eksperimenta (ponedeljak) - Na osnovu dobijenih mikrobioloških rezultata formirane su konačne liste odabranih grla koja ulaze u eksperiment od sledećeg jutra i takva grla su identifikovana označavanjem na tabli iznad ležišta u štali, da bi se prevenirale moguće greške u daljim koracima.

II deo (izvršna faza) je trajao od petog do jedanaestog (poslednjeg dana eksperimenta) i sastojao se od sledećih koraka:

1. **Peti dan** eksperimenta (utorak) -nakon obavljene jutarnje muže, vršeno je uzorkovanje (na istovetan način kod svih 40 grla uključenih u eksperiment) i to:
 - a. pune krvi iz *v. iugularis* (za kvantitativno-kvalitativni test fagocitne sposobnosti i respiratornog praska neutrofilnih granulocita i monocita), u vakutejner epruvete sa heparinom.
 - b. uzorka mleka iz CMT pozitivnih četvrti (u slučaju dve ili više četvrti uziman je zbirni uzorak iz tih četvrti za kvantitativno-kvalitativni test fagocitne sposobnosti i respiratornog praska neutrofilnih granulocita i monocita), pred sam početak muže, nakon odbačenih prvih par mlazeva mleka;
 - c. drugog uzorka pune krvi iz *v. iugularis* (za hematološke analize sa diferencijalnom leukocitarnom formulom) kada su korišćene vakutejner epruvete sa EDTA, neposredno nakon obavljene muže.
2. **Peti do deveti dan** eksperimenta (utorak-subota) – sprovedena je terapija jedinki tretirane gupe, injekcionim preparatom vitamina C u trajanju od 5 dana odmah po završenoj jutarnjoj muži. U istom vremenskom rasporedu, kontrolna grupa je dobijala fiziološki rastvor. Terapija je sprovedena isključivo nakon završene muže, sa ciljem da se izbegne negativni efekat stresa na samu mužu.
3. **Jedanaesti-poslednji dan** eksperimenta (drugi ponedeljak) – vršeno je uzorkovanje (na istovetan način kod svih 40 grla uključenih u eksperiment) i to:
 - a. pune krvi iz *v.iugularis* (za kvantitativno-kvalitativni test fagocitne sposobnosti i respiratornog praska neutrofilnih granulocita i monocita) uz korišćenje vakutejner epruveta sa heparinom, neposredno nakon muže;

- b. uzoraka mleka iz CMT pozitivnih četvrti (u slučaju dve ili više četvrti uziman je zbirni uzorak iz tih četvrti za kvantitativno-kvalitativni test fagocitne sposobnosti i respiratornog praska neutrofilnih granulocita i monocita), pred sam početak muže, nakon odbačenih nekoliko prvih par mlazeva mleka;
- c. drugog uzorka pune krvi iz *v. iugularis* (za hematološke analize) kad su korišćene vakutejner epruvete sa EDTA, neposredno nakon obavljene muže;
- d. uzoraka mleka iz svake četvrti koji su na CMT testu pokazala pozitivnu reakciju sa samog početka (prvog dana) eksperimenta, pojedinačno u sterilne epruvete za dalju mikrobiološku analizu.

4.2.1. Terapija injekcionim preparatom vitamina C

Ova terapija je sprovedena jednom dnevno u trajanju od 5 uzastopnih dana i to isključivo posle jutarnje muže. Preparat je aplikovan potkožno u preskapularnoj regiji na više mesta, da bi se umanjio efekat iritacije na mestu aplikacije.

Za terapiju je korišćen injekcioni preparat vitamina C ("Vitamin C", VZ Subotica, R. Srbija), sa 100 mg askorbinske kiseline po mL injekcionog rastvora, pakovan u bočicama od 50mL.

Jednokratna dnevna doza po grlu je bila u proseku 25mg/kg telesne mase, odnosno 125 mL preparata jednom dnevno tokom 5 terapijskih dana. Za samu aplikaciju su korišćene sterilne plastične brizgalice za jednokratnu upotrebu zapremine 50 mL i igle dimenzija 1,25 x 25 mm 18G, (Kruuse, Danska).

4.3. Uzorkovanje materijala za laboratorijske analize

4.3.1. Uzorkovanje krvi

Venepunkcijom su uzimana po dva uzorka pune krvi od svih grla uključenih u ogled u isto vreme, po dva puta tokom trajanja eksperimenta. Prvo uzorkovanje je obavljano pred sam početak terapije (5. dan ogleada), neposredno nakon obavljene jutarnje muže a drugo po završetku terapije (11. dan ogleada) i to na isti način.

Krv je uzorkovana punkcijom *v.iugularis* i prvi uzorak koji je namenjen za analizu krvne slike je bio uzorkovan u vakutajnere sa EDTA antikoagulansom zapremine 5 mL (Kruuse, Denmark), dok je drugi uzorak, namenjen za analizu fagocitne sposobnosti i

respiratornog praska neutrofilnih granulocita i monocita uzorkovan u vakutajnere zapremine 6 mL sa 102 IU Litijum-heparina kao antikoagulansa (BD Vacutainer[®], Plymouth, Velika Britanija).

Odmah po uzorkovanju, svi uzorci krvi su složeni u frižider torbu sa ledenim ulošcima, i slojem stiropora koji je sprečavao direktan kontakt leda sa epruvetama. Uzorci su zatim transportovani do laboratorije gde su vršene analize u narednih 4-8 sati.

4.3.2. Uzorkovanje mleka

4.3.2.1. Uzorkovanje mleka za mikrobiološku analizu i određivanje broja somatskih ćelija

Neposredno pre uzimanja uzoraka mleka, papile vimena su dezinfikovane vatom natopljenom sa 70% alkoholom. Uzorci su uzimani u skladu sa procedurom Nacionalnog Saveta za Mastitis (NMC – The National Mastitis Council; Anon, 2001), na način kojim se mogućnost kontaminacije mleka svodi na najmanju moguću meru.

Na osnovu rezultata CM testa pred jutarnju mužu (1. dan ogleda), uzorkovano je mleko samo od grla koja su pozitivno reagovala (++, +++) i to na propisan način iz svake pozitivne četvrti pojedinačno u sterilne epruvete. Na kraju ogleda (11. dan) je mleko uzorkovano drugi put, iz istih četvrti, na isti način i u isto vreme.

4.3.2.2. Uzorkovanje mleka za utvrđivanje fagocitne sposobnosti i respiratornog praska

Pred sam početak muže je pristupano uzorkovanju 2x50 mL mleka iz CMT (++, +++) pozitivnih četvrti sa početka ogleda i to dva puta tokom ogleda. Prvo uzorkovanje je bilo 5-og dana ogleda, a drugo 11-og, poslednjeg dana. Za uzorkovanje su korišćene sterilne kivete sa konusnim dnom i postoljem (slika 4.1.), zapremine 50 mL dimenzija Ø30 x 115mm, (Greiner Bio-One, Nemačka). Mleko je uzimano nakon odbačenih prvih par mlazeva iz CMT pozitivnih četvrti utvrđenih prvog dana eksperimenta. U slučajevima u kojima je bilo dve ili više četvrti uziman je zbirni uzorak iz tih četvrti.

Uzorci su odmah postavljeni u frižider - torbe sa ledenim ulošcima. Direktan kontakt mleka i ledenih uložaka sprečen je stiroporskom pločom. Temperatura uzoraka tokom transporta iznosila je od 4-10 stepeni °C. Uzorci su dopremani do NIV-NS i obrađeni su u

roku od 4-8 sati nakon muže. Tokom transporta u frižider torbi, temperatura uzoraka nije prelazila 10°C.



Slika 4.1. Sterilna kiveta za mleko sa konusnim dnom i postoljem

4.4. Laboratorijske analize

Sve laboratorijske analize su izvršene u tri laboratorije:

- a) VetLab Beograd (mikrobiološka analiza uzoraka mleka i hematološka analiza uzoraka pune krvi sa leukocitarnom formulom)
- b) Laboratorija Odeljenja za reprodukciju Naučnog instituta za veterinarstvo “Novi Sad”, (kvantitativno-kvalitativni test fagocitne sposobnosti i respiratornog praska neutrofilnih granulocita i monocita iz uzoraka pune krvi i mleka) i
- c) Laboratorija za ispitivanje kvaliteta mleka, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

4.4.1. Mikrobiološka analiza uzoraka mleka i određivanje broja somatskih ćelija

Uzorci mleka su nakon centrifugiranja i odlivanja supernatanta zasejavani na hranljive podloge: Columbiaa agar sa dodatkom 5% ovčije krvi (Biomeriux, Francuska), MacConkey agar (Biomeriux, Francuska) i Sabouraud dekstrozni agar (Biomeriux, Francuska). Petrijeve ploče sa zasejanim uzorcima mleka su inkubirane 72 časa u aerobnoj sredini na 37 °C odnosno na 25 °C (Sabouraud dekstrozni agar) pri čemu je rast bakterijskih kolonija proveravan svakodnevno. Nakon inkubacije, izolovane kolonije bakterija su presejavane radi

dobijanja čistih kultura na Columbiaagar sa dodatkom 5% ovčije krvi (Biomeriux, Francuska) i hranljivi agar (Himedia) dok su izolovane gljivice presejavane na Sabouraud dekstrozni agar. Identifikacija izolovanih bakterija i gljivica je izvedena na osnovu njihovih kulturelnih osobina, testova katalaze, oksidaze i biohemijskih osobina.

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

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

Patogene gljivice su identifikovane nakon rasta na Sabouraud dekstroznom agaru, njihovih kulturelnih osobina i rasta na chrom ID Candida agaru (Biomerieux, France).

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

4.4.2. Kompletna krvna slika

Ove analize su izvršene na hematološkom analizatoru Hemavet 950 FS (Drew Scientific, SAD) najkasnije do 6 sati od uzorkovanja, u okviru kojih je analizirana bela krvna loza, diferencijalna leukocitarna formula, crvena krvna loza i trombociti. Referentne vrednosti za hematološke parametre krava su prikazane na slici 4.2.

Kompletna krvna slika			
Bela krvna loza	Rezultat	ref.vrednost	jedinice
WBC- leukociti	6,54	4-12 x 10 ⁹	ćelija/L
NE- neutrofilni granulociti	3,27	0,6-4,1x 10 ⁹	ćelija/L
LY- limfociti	1,95	2,5-7,5x 10 ⁹	ćelija/L
MO- monociti	0,19	0,0-1,2x 10 ⁹	ćelija/L
EO- eozinofilni granulociti	1,07	0,0-2,4x 10 ⁹	ćelija/L
BA- bazofili	0,06	0,0-0,4x 10 ⁹	ćelija/L
NRBC-nezreli eritrociti (opisno)		retki	
Dif. leu. form.			
NE- neutrofilni granulociti	50,10	15,0-47,0	%
LY- limfociti	29,70	45,0-75,0	%
MO- monociti	2,90	0,0-11,0	%
EO- eozinofilni granulociti	16,40	0,0-20,0	%
BA- bazofili	0,90	0,0-3,5	%
Crvena krvna loza			
Eritrociti	5,39	5,0-10,0x10 ¹²	ćelija/L
Hemoglobin	8,0	8,0-15,0	g/dL
Hematokrit	22,7	24,0-46,0	%
MCV	42,2	40,0-60,0	fL
MCH	14,8	11,1-17,0	pg
MCHC	35,1	28,2-36,0	g/dL
RDW	24,9	12,0-27,0	%
Retikulociti(aps)			ćelija/ μ L
Retikulociti%			%
Trombociti			
PLT-trombociti	191	200-800x10 ⁹	ćelija/L
MPV	8,5	5,0-20,0	fL

Slika 4.2. Referentne vrednosti hematoloških parametara krava

Analize su kod svih grla rađene dva puta u isto vreme: prvi put-petog dana i drugi put-jedanaestog dana eksperimenta.

4.4.3. Analiza fagocitne sposobnosti neutrofilnih granulocita i monocita (fagotest reakcija neutrofilnih granulocita i monocita)

Za kvantitativno i kvalitativno određivanje fagocitne sposobnosti leukocita iz uzoraka pune krvi krava sa dodatkom heparina i iz uzoraka mleka, korišćen je komercijalni kit „PHAGOTEST[®] (Glykotype Biotechnology GmbH, Heidelberg, Nemačka). Kao fagocitne čestice su korišćene opsonizovane bakterije *E. coli* obeležene fluoresceinom (FITC - fluorescein-izo-tio-cijanat). Ovim testom se utvrđuje procenat monocita i granulocita koji su

izvršili fagocitozu (jedne ili više bakterija), kao i fagocitne sposobnosti pojedinačnih ćelija (broj fagocitovanih bakterija po ćeliji), što određuje njihovu aktivnost.

Treba napomenuti da su bakterije *E. coli* opsonizovane imunoglobulinima i sistemom komplementa iz zbirnog seruma radi olakšavanja fagocitoze. Ćelije fagocitnog sistema (PMNL i eozinofilni granulociti) poseduju receptore za komponentu komplementa (C3b) kao i za Fc fragmente imunoglobulina preko kojih je omogućena adherencija ćelije za površinu bakterije.

Postupak izvođenja testa fagocitoze (phago-test reakcija):

Postupak sa uzorcima mleka: Za izolaciju leukocita iz punomasnog mleka korišćena je modifikacija metode po Mehrzad-u i sar. (2002). Uzorci mleka su odlivani u konusne sterilne polipropilenske kivete za centrifugu (Nunc, Thermo Fisher Scientific Inc., SAD) zapremine 50 mL. U kivete je odlivano 25 mL mleka i razređeno istom količinom hladnog PBS rastvora čuvanog u frižideru (odnos 1:1). Pre obrade uzoraka mleka, centrifuga je takođe podešena na temperaturu od 4°C, čime se obezbeđuje hladni lanac tokom celokupnog postupka izolacije ćelijskih elemenata iz mleka (faza mirovanja-neaktivna faza).

Radi razdvajanja mlečne masti (supernatanta), mleka i ćelijskih elemenata, mleko je najpre centrifugovano u Eppendorf centrifugi (Eppendorf 4564, Nemačka; 600 g, 4 °C, 5 minuta). Izdvojen sloj masti na vrhu je odvajan kašičicom, povremeno i uz upotrebu filter papira. Supernatant je pažljivo odliven u jednom laganom potezu vodeći računa o tome da se sediment ne podigne. Pelet je pažljivo homogenizovan na Vorteks mešalici i resuspendovan sa novih 40 mL hladnog PBS rastvora, u koji je dodato 5 mL RMPI 1640 sa HEPES-om i L-glutaminom (GE Healthcare, Austrija) radi umanjenja adhezije ćelijskih elemenata i stvaranja ugrušaka koji ometaju protok kroz kapilarnu cev uređaja za protočnu citometriju i pravilno očitavanje. Centrifugiranje se zatim ponavlja na 500 g i 4°C tokom 15 minuta. Ovaj postupak, sa kraćim vremenom centrifugiranja, ponavlja se još jednom. Time su ćelijski elementi mleka grupisani, oslobođeni sadržaja mleka (pre svega, mlečne masti) i spremni za dalji rad. Na posletku, pipetom je odlivano po 200 µL sedimenta u polistirenske epruvete zapremine 5 mL (12 x 75 mm, "U" oblika dna, BD Science, Bedford, MA, SAD). Pre dodavanja bakterija, mleko je inkubirano na ledenom bloku tokom 10 minuta kako bi se ohladilo na 4°C. Po tri epruvete su služile kao kontrole.

Postupak sa uzorcima krvi:

Uzorci pune heparinizovane krvi su homogenizovani sporim rotiranjem-okretanjem epruvete. Pipetom je odlivano po 100 μ L uzorka u polistirenske epruvete zapremine 5mL (12 x 75 mm, "U" oblika dna, BD Science, Bedford, MA, SAD). Pre dodavanja bakterija, krv je takođe inkubirana na ledenom bloku tokom 10 minuta kako bi se ohladila na 4°C. Po tri epruvete bez dodatih bakterija su služile kao kontrole.

- Aktivacija: Suspenzija *E. coli* je ohlađena u ledenom bloku i prvo je homogenizovana uz pomoć Vorteks mešalice (EV-102, Tehtnica, Železniki, Slovenija), a zatim je po 20 μ L suspenzije *E. coli* dodavano u uzorke pune krvi, odnosno, obrađene uzorke mleka.
- Inkubacija: Smeša pune krvi ili obrađeni uzorci – sediment mleka i suspenzija *E. coli* bakterija su pažljivo promešani Vortex aparatom, a kontrolni uzorci su ostavljeni na ledenom bloku. Uzorci krvi ili obrađeni uzorci – sediment mleka su inkubirani tokom 10 minuta na 37°C u Eppendorf termomikseru (Thermomixer comfort, Eppendorf, Nemačka), zaštićeno od izvora svetlosti, uz blago mešanje na 350 obrtaja/min.
- Gašenje viška fluorescencije:
Tačno posle isteka vremena inkubacije od 10 minuta, svi uzorci su istovremeno vađeni i premešteni na ledene blokove kako bi se zaustavila fagocitoza. Zatim je dodavano po 100 μ L hladnog rastvora tripan plavog radi gašenja fluorescencije bakterija koje nisu fagocitovane (preostalih u medijumu ili adheriranih na površinu ćelija) i viška fluorescentne boje. Istovremeno su krv ili obrađen uzorak-sediment mleka razređivani sa 3 mL hladnog puferizovanog rastvora za ispiranje (engl. *Washing solution*).
- Uzorci su zatim centrifugirani (Eppendorf 4564, Nemačka; 250g, 4°C, 5 minuta). Supernatant je odlivan, a sediment je resuspendovan dodavanjem 3 mL hladnog puferizovanog rastvora za ispiranje i pažljivo homogenizvan uz pomoć Vorteks aparata. Postupak ispiranja i centrifugiranja je ponavljan, do iščezavanja plavog prebojavanja tripan plavom bojom.
- Liziranje, permeabilizacija ćelijske membrane i fiksiranje je vršeno dodavanjem 2 mL lizirajućeg rastvora i inkubacijom na sobnoj temperaturi tokom 20 minuta u mraku. Time je proces fagocitoze u potpunosti zaustavljen, razoreni su eritrociti a leukociti su permeabilizovani radi ulaska propidijum jodida (PJ) u strukturu jedra. Uzorci su centrifugirani a potom ponovo isprani puferizovanim rastvorom kako bi se uklonio

debris liziranih crvenih krvnih zrnaca. Na kraju je sediment resuspendovan sa 200 μ L rastvora PJ (u koncentraciji od 50 mg/mL PBS rastvora), bojom za DNK mrtvih ćelija. Uzorci su očitavani u roku od 30 minuta.

4.4.4. Analiza respiratornog praska neutrofilnih granulocita i monocita (fago-burst reakcija neutrofilnih granulocita i monocita)

Princip rada testa: Radi kvantitativnog određivanja proizvoda oksidativnog (respiratornog) praska iz uzoraka heparinizovane pune krv ili obrađenih uzoraka-sedimenta mleka, korišćen je komercijalni test „PHAGOBURST[®]” (Glykotype Biotechnology, GmbH, Heidelberg, Nemačka). Test sadrži neobeležene opsonizovane bakterije *E. coli*, forbol 12-miristat 13-acetat (PMA) i hemotaktički peptid N-formil-Metil-Leucil-Fenil (fMLP) kao stimulatore oksidativnog praska. Kao hemotaktički peptid, fMLP se smatra slabim fiziološkim stimulatorom oksidativnog praska, *E. coli* je čestični stimulator praska i smatra se umerenim stimulatorom, dok se ligand protein kinaze C (PMA) smatra snažnim stimulatorom oksidativnog praska.

Nakon stimulacije, granulociti i monociti proizvode reaktivne metabolite (superoksidne anjone, hidrogen peroksid i hipohlornu kiselinu) kojima uništavaju bakterije unutar fagozoma. Formiranje reaktivnih peroksida se može pratiti dodavanjem i oksidacijom dihidro-rodamina (DHR) 123, kao bojenog reagensa-indikatora reakcije. Reakcija se zaustavlja dodavanjem rastvora za liziranje kojim se uklanjaju eritrociti i vrši delimična fiksacija leukocita. Nakon jednog koraka ispiranja sredstvom za ispiranje (engl. *washing solution*) dodaje se PJ kao rastvor za prebojavanje DNK i isključivanje artefakata nastalih agregacijom bakterija ili ćelija. Zatim se analizira procenat ćelija koji je proizveo reaktivne peroksidne radikale (što daje podatak o tome koliko će ćelija izvršiti konverziju DHR 123 u R 123) kao i njihov prosečan intenzitet fluorescencije (enzimsku aktivnost, intenzitet i kvalitet reakcije tj. količinu R 123 po ćeliji).

Postupak izvođenja testa respiratornog praska (phago-burst reakcija):

- Postupak sa uzorcima: Uzorci pune heparinizovane krvi ili obrađenog uzorka-sedimenta mleka su blago promešani i zatim je mikropipetom odlivano po 100 μ L (krv), odnosno 200 μ L (uzorak sedimenta mleka) u polistirenske epruvete od 5 mL (12 x 75 mm, “U” oblik dna, BD Science, Bedford, MA, SAD). Pre dodavanja

bakterija, krv ili obrađen uzorak mleka su inkubirani na ledenom bloku tokom 10 minuta kako bi se ohladili na 4°C.

- **Aktivacija:** U kontroli testa su korišćene četiri epruvete. Tri su stimulisane sa po 20 µl opsonizovanih, neobebeženih *E. coli*, PMA ili fMLP i ohlađene na temperaturu frižidera. Kao blagi stimulator respiratornog praska, u pozitivnoj kontroli korišćen je fMLP kao, kao srednji *E. coli* a kao jak PMA. U četvrtoj epruveti je kao negativna kontrola korišćen uzorak krvi ili obrađen uzorak mleka kome je dodat samo rastvor za ispiranje (*washing solution*). Za dalje testiranje uzoraka krvi u proizvodnji ROS korišćen je samo PMA.
- **Inkubacija:** Nakon identične preinkubacije na ledenom ležištu (10 minuta na 4°C), uzorci krvi ili obrađeni uzorci-sediment mleka su bili inkubirani tokom 10 minuta na 37°C u Eppendorf termomikseru u mraku i istovremeno homogenizovani na 350 obrtaja/minuti.
- U uzorke je zatim dodavano 40 µL DHR rastvora (dvostruko više od preporučene doze) i uzorci su ponovo inkubirani u narednih 10 minuta (38°C u Eppendorf termomikseru i istovremeno homogenizovani na 350 obrtaja/min. u mraku).
- **Liziranje:** Na kraju druge inkubacije, u uzorke je dodavan rastvor za fiksiranje, liziranje i zaustavljanje reakcije (engl. *lysing solution*) i uzorci su inkubirani tokom 20 minuta na sobnoj temperaturi u mraku.
- Zatim su uzorci centrifugirani na 250 g i 4 °C u trajanju od 5 minuta.
- Nakon toga je odlivan supernatant, a sediment je resuspendovan sa 3 mL hladnog puferizovanog rastvora za ispiranje (engl. *washing solution*). Drugo centrifugiranje je izvedeno na 250 g i 4°C u trajanju od 5 minuta i talog je resuspendovan sa 200 µL boje za DNK (rastvor PJ u koncentraciji 50 mg/mL u PBS rastvoru). Rastvor je homogenizovan na Vorteks mešalici i inkubiran na ledu tokom 10 minuta, zaštićen od svetla do trenutka očitavanja (u narednih 30 minuta).

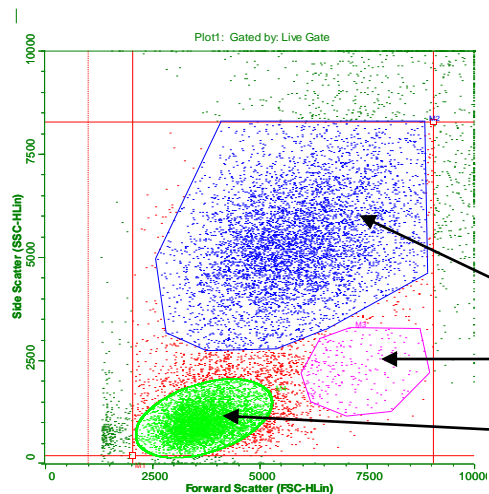
Postupak analize ćelija protočnom citometrijom

Ćelije su analizirane na uređaju za protočnu citometriju Guava Easy Cyte (Guava Technologies, Hayward, California, SAD). U svim uzorcima je analizirano najmanje 10 000 čestica.

Najpre se na prvom "plotu" ("live gate"- histogramu za crvenu fluorescencu) odvajaju ćelije koje se odlikuju crvenom fluorescencijom (prebojavanje DNK), odnosno, koje su barem jednake po istovetnom DNK sadržaju, kao što su diploidne ćelije goveda. Time se postiže isključivanje agregata bakterija koje imaju slične fizičke osobine, veličinu i granuloznost nastalu usled agregacije, ali nemaju crvenu fluorescenciju.

Na sledećem dijagramu (slika 4.3.) prikazano je razvrstavanje ćelija prema veličini (engl. *FSC-forward scatter*, x-osa) i prema unutrašnjoj strukturi i zastupljenosti granula (engl. *SSC-side scatter*, y-osa) što olakšava označavanje odgovarajuće grupacije leukocita. Zatim se podešavaju parametri za veličinu i strukturu i ti podaci se pamte (memorišu) u samom uređaju. Granulociti se odlikuju srednjom veličinom i složenom granularnom građom (zauzimaju sredinu plota tj. dijagrama). Kako su limfociti manji i kompaktnije strukture, na dijagramu se nalaze dole i levo, dok su monociti kao veće ćelije, a slične strukture, pozicionirani dole i desno.

Da bi se iz analize isključili debris i bakterije koje nisu fagocitovane, aparat je podešen tako da se na histogramu analize fagotesta i fagobursta obuhvate samo ćelije koje su obojene sa PJ. Zbog toga je opseg veličine ćelija za prikazivanje (engl. *background scatter*) bio redukovan.



Slika 4.3.

Razvrstavanje ćelija prema veličini (engl. *forward scatter*) i prema unutrašnjoj strukturi (engl. *side scatter*) i označavanje odgovarajuće grupacije leukocita.

Neutrofilni leukociti

Monociti

Limfociti

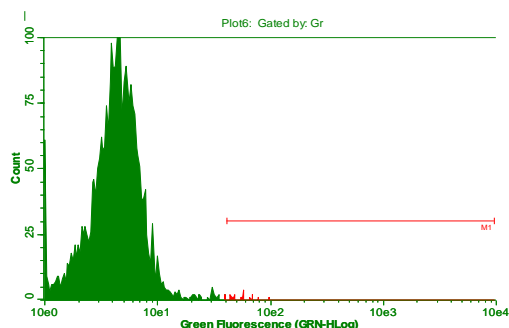
Kontrolni uzorci (uzorak bez stimulatora u reakciji Phagoburst, odnosno, uzorak čuvan na ledu u reakciji Phagotest) služe za određivanje graničnih vrednosti nulte reakcije i elektronska "vrata" se postavljaju tako da je maksimalno do 2% PMNL ili monocita pozitivno (slika 4.4.). Nakon inkubacije, ćelije sa pozitivnom reakcijom imaju različit

intenzitet zelene fluorescentne boje koja potiče od reakcije Rodamina 123 ili ingestiranih *E. coli* obeleženih FITC-om (obe fluoresciraju zelenim spektrom) i na skali zelene fluorescence (x-osa, engl. *green fluorescence* - GRN-HLog) skreću u desno, u zavisnosti od intenziteta reakcije (slike 4.5., 4.7. i 4.8.). Uporedna analiza kontrolnih i pozitivnih uzoraka (preklapanjem plotova), gde je jasno uočljiv razmak između aktiviranih i neaktiviranih uzoraka ukazuje na dobro izvršenu kontrolu (slika 4.6.). Dobra je praksa da se kontrola pozitivnih i negativnih reakcija proveriti i uz pomoć fluorescentnog mikroskopa, bar dok se izvrše podešavanja na protočnom citometru (slike 4.9. i 4.10.).

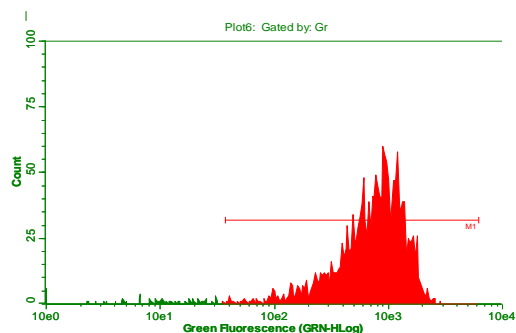
Kvalitet (jačina) respiratornog praska pojedinačnih ćelija u fagoburst testu, odnosno, broju fagocitovanih bakterija u fagotestu, izražava se kroz srednju vrednost pozitivnih reakcija, odnosno, srednji intenzitet fluorescence (engl. *mean fluorescence intensity*-MFI) (obračunato po Menge-u i saradnicima, 1998).

Indeks prosečne fagocitoze ili respiratornog praska:

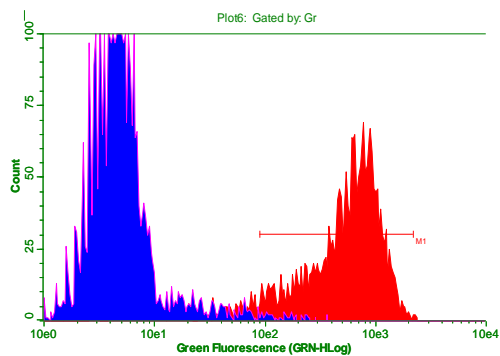
$$\text{MFI: [index = (\% \text{ pozitivnih ćelija}) \times (\text{MFI}) / 100]}$$



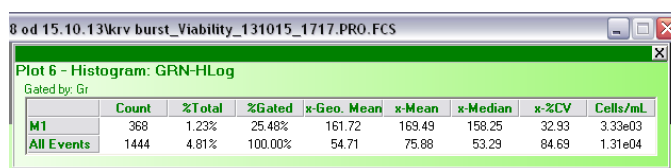
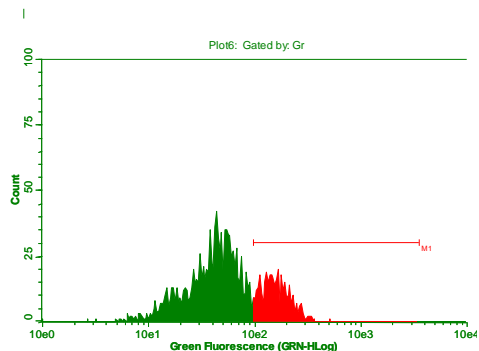
Slika 4.4. Kontrola na ledu, PMNL ne "skreću" u desno (<2%) jer u sebi nemaju zelenu fluorescencu poreklom od fagocitovanih bakterija *E. coli*



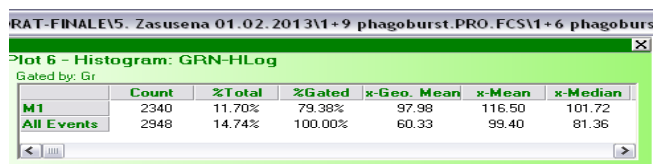
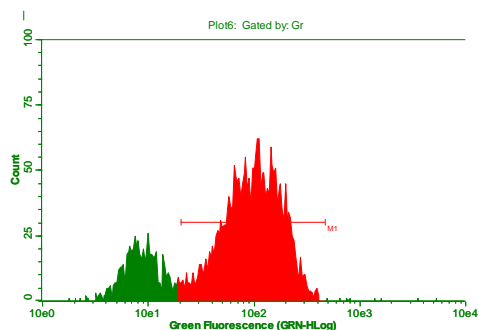
Slika 4.5. Reakcija nakon inkubacije, snažna fagocitoza, > 90% ćelija sa pozitivnom reakcijom-fagocitozom FITC obeleženih bakterija *E. coli*



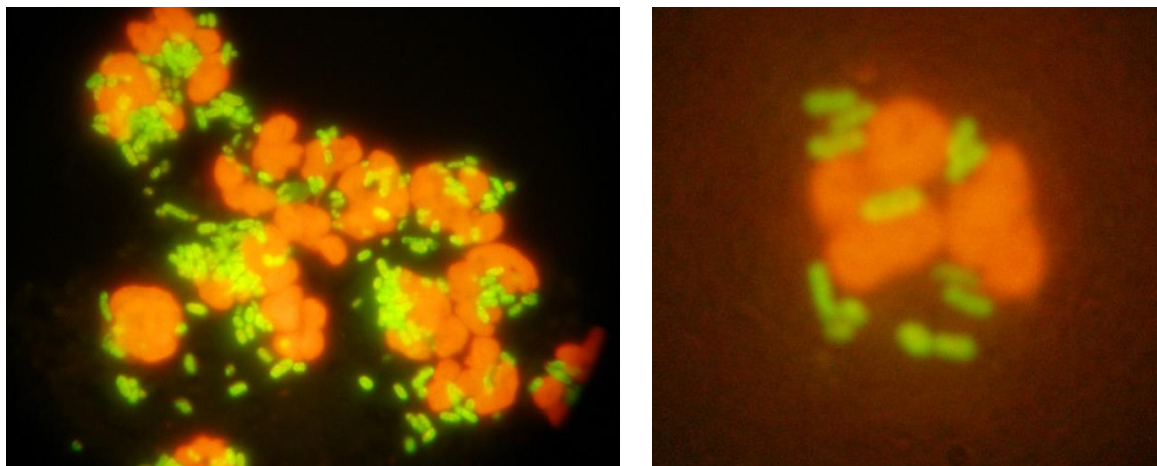
Slika 4.6. Uporedni histogram reakcije fagocitoze neutrofilnih granulocita pre aktivacije (nulta kontrola, uzorak čuvan na ledu, stubac sa leve strane plave boje) i nakon aktivacije (temperatura 38°C tokom 10 minuta), stubac sa desne strane crvene boje (fagocitoza >90%).



Slika 4.7.: Slaba ROS reakcija (25,48% pozitivnih ćelija)



Slika 4.8.: Intenzivna ROS reakcija (79,30% pozitivnih ćelija)



Slike 4.9. i 4.10. Fagocitoza bakterija *E. coli* zelene fluorescence obeleženih FITC-om od strane PMNL krvi, vidljivih po obojenim režnjevima jedara (crvene fluorescence PJ) (fluorescentna mikroskopija, pod imerzionim uljem, uveličanje 400×-slika levo i 1000×-slika desno).

4.5. Statistička obrada rezultata

Radi bolje preglednosti, rezultati dobijeni ovim ispitivanjima su prikazani tabelarno i u vidu dijagrama. Od deskriptivnih statističkih parametara izračunavane su:

- aritmetička sredina (\bar{x});
- standardna devijacija (SD);
- standardna greška (S_x);
- koeficijent varijacije (CV%) i
- interval varijacije (IV).

Statističke značajnosti izračunate su jednostranom ANOVA (analizom varijanse) i Studentovim testom (*t*-test). Vrednosti za **p** manje od **0,05** smatrane su značajnim.

Ove analize vršene su primenom PC programskog paketa Edustat 2.04. (R. Srbija) i Statistica 8 (Stat Soft, Inc., Tula, SAD).

5. REZULTATI

Radi bolje preglednosti, rezultati postignuti u ovoj doktorskoj disertaciji su, u skladu sa postavljenim istraživačkim ciljevima i zadacima, prikazani u sledeća četiri potpoglavlja:

5.1. Rezultati CM testa, mikrobiološke analize mleka i broja somatskih ćelija u kontrolnoj i ogleđnoj grupi pre i nakon terapije vitaminom C;

5.2. Rezultati ispitivanja hematološkog profila nakon terapije vitaminom C;

5.3. Rezultati ispitivanja funkcionalne aktivnosti polimorfonuklearnih leukocita i monocita krvi krava nakon terapije vitaminom C;

5.4. Rezultati ispitivanja funkcionalne aktivnosti polimorfonuklearnih leukocita i monocita iz mleka krava nakon terapije vitaminom C.

Na početku ovog poglavlja izneti su osnovni podaci o kravama u ogledu (tabela 5.0.1.). Deskriptivni statistički parametri o vremenu (momentu) uzorkovanja krvi i mleka nakon teljenja, prikazani su u tabeli 5.0.2.

Tabela 5.0.1. Podaci o kravama na početku ogleda

Kategorija krava	Redni broj laktacije	Broj grla	Udeo u ogledu
1. laktacije	1	15	37,50%
2. laktacije	2	11	27,50%
3. laktacije	3	8	20,00%
4. laktacije	4	4	10,00%
5. laktacije	5	2	5,00%
Ukupno	-	40	100%
Prosek	2,17±1,96	-	-

U cilju ispitivanja kvaliteta mleka, kompletne krvne slike, funkcionalne sposobnosti (fagocitoza i respiratorni prasak) PMNL i monocita iz krvi i iz mleka, ukupno je analizirano 30 grla, pre i 7. dana nakon petodnevnog tretmana vitaminom C, dok je 10 grla služilo kao kontrola (bez tretmana - injekcije fiziološkog rastvora).

Prosečan broj laktacija u analiziranoj grupi plotkinja je iznosio 2,17±1,96. Od toga je 6 grla (15%) bilo sa 4 i više laktacija, što govori da je analizirana grupa krava bila relativno mlada i u proseku na početku druge laktacije.

Tabela 5.0.2. Vreme uzorkovanja mleka i krvi radi izvođenja CM testa i bakterioloških pretraga mleka, hematološkog profila i ispitivanja funkcije PMNL i monocita nakon teljenja (osnovni statistički parametri)

Vreme uzorkovanja	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x
DL kod prvog uzorkovanja	23,19	14,00	30,00	3,70	15,97	0,61
DL kod poslednjeg uzorkovanja	30,19	21,00	37,00	3,70	12,27	0,61

DL - dana laktacije

Kao što se vidi iz tabele 5.0.2., prvo uzorkovanje mleka i krvi, radi izvođenja CM testa i bakterioloških pretraga mleka, hematološkog profila i ispitivanja funkcija PMNL i monocita izvršeno je $23,19 \pm 3,70$. dana nakon teljenja, dok je ponovljeno uzorkovanje izvršeno 7 dana kasnije, odnosno, prosečno sa $30,19 \pm 3,70$. dana laktacije.

5.1. Rezultati CM testa, mikrobiološke analize mleka i određivanja broja somatskih ćelija u kontrolnoj i oglednoj grupi (pre i nakon terapije vitaminom C)

Rezultati postignuti u okviru ovog istraživačkog zadatka su prikazani kao: rezultati CM testa, rezultati mikrobiološke analize uzoraka mleka i rezultati određivanja broja somatskih ćelija. Oni su prikazani tabelarno i uključuju rezultate u uzorcima pre i nakon terapije vitaminom C za obe grupe (ogledna i kontrolna grupa).

5.1.1. Rezultati CM testa

Iz ogledne grupe od 30 krava ukupno je analizirano 36 četvrti: kod 24 po jedna i kod 6 krava po dve. U kontrolnoj grupi od 10 krava analizirano je 12 četvrti: kod osam krava po jedna i kod dve plotkinje po dve četvrti. Rezultati CM testa su prikazani u tabeli 5.1.1.

Tabela 5.1.1. Prikaz rezultata CM testa svih grla u ogledu

VREDNOST REZULTATA CMT TESTA	OGLEDNA GRUPA				KONTROLNA GRUPA			
	POČETAK		KRAJ		POČETAK		KRAJ	
	UKUPAN BROJ REZULTATA	PROCENAT REZULTATA	UKUPAN BROJ REZULTATA	PROCENAT REZULTATA	UKUPAN BROJ REZULTATA	PROCENAT REZULTATA	UKUPAN BROJ REZULTATA	PROCENAT REZULTATA
+++	14	38,89	3	8,33	4	33,33	5	41,67
++	22	61,11	6	16,67	8	66,67	6	50,00
+	0	0	2	5,55	0	0	0	0
+-	0	0	1	2,78	0	0	0	0
-	0	0	24	66,67	0	0	1	8,33
UKUPNO	36	100	36	100	12	100	12	100

Rezultati ispitivanja su nedvosmisleno ukazali da je u ogleđnoj grupi krava došlo do veoma značajnog poboljšanja rezultata CM testa nakon završene terapije injekcionim preparatom vitamina C. Izlećenje je postignuto kod 24 (negativan CMT rezultat) četvrti od ukupno 36, odnosno u 66,67% slučajeva. U isto vreme, rezultati su na kraju ogleđa u kontrolnoj grupi (bez terapije vitaminom C) ostali slični nakon završenog tretmana.

5.1.2. Rezultati mikrobiološkog ispitivanja uzoraka mleka svih grla u ogleđu

U tabeli 5.1.2. dat je prikaz rezultata mikrobiološkog ispitivanja uzoraka mleka iz CMT pozitivnih četvrti svih grla iz ogleđne i kontrolne grupe, sa brojem i procentom izolovanih sojeva bakterija i gljivica.

Tabela 5.1.2. Prikaz rezultata mikrobiološkog ispitivanja pojedinačnih uzoraka mleka iz CMT pozitivnih četvrti svih grla iz ogleđne i kontrolne grupe, sa brojem i procentom izolovanih sojeva bakterija i gljivica

Mikrobiološki nalaz	OGLEDNA GRUPA				KONTROLNA GRUPA			
	početak		kraj		početak		kraj	
	Broj izolovanih sojeva	Procenat izolovanih sojeva	Broj izolovanih sojeva	Procenat izolovanih sojeva	Broj izolovanih sojeva	Procenat izolovanih sojeva	Broj izolovanih sojeva	Procenat izolovanih sojeva
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	16,00	10	15,15	6	18,18	6	17,65
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7	9,34	6	9,09	3	9,1	4	11,76
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	1,33	0	0	2	6,06	2	5,88
<i>Staphylococcus haemoliticus</i>	3	4,00	0	0	0	0	1	2,94
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	1	1,33	0	0	2	6,06	2	5,88
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	2,67	2	3,03	0	0	0	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	4	5,33	2	3,03	0	0	0	0
<i>Streptococcus uberis</i>	1	1,33	0	0	1	3,03	1	2,94
<i>Corynebacterium bovis</i>	1	1,33	2	3,03	1	3,03	0	0
<i>Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes</i>	4	5,33	3	4,55	1	3,03	1	2,94
<i>Bacillus cereus</i>	2	2,67	0	0	1	3,03	1	2,94
<i>Candida albicans</i>	1	1,33	2	3,03	0	0	0	0
<i>Prototheca sp.</i>	4	5,33	5	7,58	6	18,18	5	14,71
Nepatogeni izolat*	32	42,68	34	51,51	10	30,30	11	32,36
UKUPNO	75	100	66	100	33	100	34	100

*od nepatogene mikroflore, u najvećem broju su izolovane bakterije iz roda *Micrococcus* i roda *Bacillus*

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

5.1.3. Rezultati ispitivanja broja mikroorganizama (CFU) u mleku krava nakon terapije vitaminom C

U cilju ispitivanja kvaliteta mleka i određivanja broja kolonija mikroorganizama nakon 7 dana od početka terapije, odnosno, dva dana od završetka terapije, visokim dozama vitamina C, izvršeno je uporedno ispitivanje uzoraka mleka poreklom od tretirane grupe krava pre i posle terapije ovim preparatom. Dobijeni rezultati su zatim upoređeni sa podacima registrovanim u kontrolnoj grupi koja nije bila tretirana vitaminom C, već istom zapreminom fiziološkog rastvora.

U tabeli 5.1.3. su izneti deskriptivni statistički parametri za broj mikroorganizama (CFU/mL) u mleku, kao i stepen statističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima.

Tabela 5.1.3. Deskriptivni statistički parametri i statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima za broj mikroorganizama u mleku krava pre i nakon tretmana vitaminom C i mleku plotkinja kontrolne grupe

Ogled (n=36)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x	<i>p</i>
CFU/ML - Početak	72 073,68	50,00	450 000	161 873,52	224,59	37 136,33	<i>p</i> >0,05
CFU/ML - Kraj	42 994,74	50,00	564 000	137 849,36	320,62	31 624,81	
Kontrola (n=12)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x	<i>p</i>
CFU/ML - Početak	74 495,83	50,00	350 000	133 425,43	179,10	38 516,60	<i>p</i> >0,05
CFU/ML - Kraj	50 612,50	50,00	212 000	75 283,43	148,74	21 732,46	

Analizom rezultata, prikazanih u tabeli 5.1.3. se može uočiti pad broja CFU/mL uz razumno visoke koeficijente varijacije u postupku određivanja broja CFU/mL, tako da nije došlo do ispoljavanja statističke značajnosti razlika. Međutim, efekat visoke doze C vitamina

se može bolje uočiti segregacijom uzoraka na uzorke do 400 000 CFU (gornja dozvoljena granica) i 100 000 CFU/mL (za ekstra klasu mleka). Na osnovu “Pravilnika o kvalitetu sirovog mleka” (2009 god.) koji određuje da je gornja granica ukupnog broja bakterija za sirovo mleko 400 000 CFU/mL, terapija C vitaminom je bila delotvorna u 52,8 % slučajeva (od 36 tretiranih četvrti kod 19 je detektovano manje od 400 000 CFU/mL), od čega je ekstra klasi pripadalo 41,67 % uzoraka mleka (15/36 četvrti sa manje od 100 000 CFU/ml).

5.1.4. Rezultati ispitivanja broja somatskih ćelija u mleku krava nakon terapije vitaminom C

U cilju ispitivanja kvaliteta mleka i broja somatskih ćelija sedmog dana od početka terapije, odnosno, dva dana od završetka terapije visokom dozom vitamina C, izvršeno je uporedno ispitivanje u mleku krava ogledne grupe pre i nakon terapije. Rezultati su zatim upoređeni sa rezultatima registrovanim u kontrolnoj grupi plotkinja koja nije tretirana vitaminom C.

U tabeli 5.1.4. su iznete vrednosti deskriptivnih statističkih parametara za broj somatskih ćelija u mleku, kao i stepen statističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima.

Tabela 5.1.4. Deskriptivni statistički parametri za broj somatskih ćelija (BSC u 000) u mleku krava, pre i nakon tretmana vitaminom C i u kontrolnoj grupi i statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima

Ogled (n=36)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x	<i>p</i>
BSC - Početak	3 730,95	805,00	17 525,00	4 311,26	115,55	989,07	
BSC - Kraj	1 299,53	4,00	7 517,00	2 070,72	159,34	475,05	<i>p</i> <0,05
Kontrola (n=12)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x	<i>p</i>
BSC - Početak	4 812,42	435,00	18 346,00	5 955,03	123,74	1.719,07	
BSC - Kraj	3 287,25	366,00	9 192,00	3 161,84	96,19	912,75	<i>p</i> >0,05

Analizom rezultata prikazanih u tabeli 5.1.4. se može uočiti značajan pad broja somatskih ćelija u mleku nakon tretmana vitaminom C, uz visoke koeficijente varijacije. Međutim, ukoliko se izvrši analiza grla na osnovu kliničkog izlečenja (odsustvo pozitivnih reakcija na CMT; broj somatskih ćelija u vrednostima oko i ispod 500 000 ćelija/mL mleka), izlečenje je utvrđeno kod 66,67 % slučajeva (24/36 četvrti). U kontrolnoj grupi, od 12 četvrti spontano je došlo do smanjenja broja ćelija samo u jednom slučaju (8,33 %).

Tabela 5.1.4a. Udeo uzoraka koji je nakon terapije imao smanjenje BSC na vrednosti od $\approx 500\ 000$ ili manje somatskih ćelija (klinički zdrave četvrti) u mleku krava pre i nakon tretmana vitaminom C, odnosno, na početku i na kraju oglada u kontrolnoj grupi

	Broj analiziranih četvrti	Broj klinički izlečenih (CMT negativno)	%	<i>p</i>
Ogledna grupa	36	24	66,67	<i>p</i> <0,05
Kontrolna grupa	12	1	8,33	

5.2. Rezultati ispitivanja hematološkog profila nakon terapije vitaminom C

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

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

U tabeli 5.2.1. su prikazani deskriptivni statistički parametri bele krvne slike kod krava pre i nakon terapije preparatom vitamina C. U tabeli 5.2.2 su dati isti podaci ali dobijeni u kontrolnoj grupi krava na početku i na kraju oglada. Statistička ocena značajnosti utvrđenih razlika između srednjih vrednosti ogledne i kontrolne grupe data je u tabelama 5.2.3 i 5.2.4.

Tabela 5.2.1. Deskriptivni statistički parametri bele krvne slike u oglednoj grupi krava, na početku i na kraju terapije

Ogledna grupa (n=30)		\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x
Σ Leukociti	Početak terapije	7,71	4,84	14,12	2,12	27,50	0,39
	Nakon terapije	7,67	4,80	12,84	1,82	23,68	0,33
Limfociti	Početak terapije	3,62	1,44	9,15	1,76	48,51	0,33
	Nakon terapije	3,33	0,29	7,57	1,67	50,28	0,31
PMNL	Početak terapije	2,94	2,02	4,05	0,55	18,59	0,10
	Nakon terapije	3,19	1,95	4,55	0,66	20,68	0,12
Monociti	Početak terapije	0,80	0,17	1,65	0,46	57,48	0,09
	Nakon terapije	0,88	0,13	3,32	0,70	79,76	0,13
Eozinofilni granulociti	Početak terapije	0,29	0,01	1,19	0,34	114,36	0,06
	Nakon terapije	0,22	0,03	1,07	0,24	109,35	0,04
Bazofilni granulociti	Početak terapije	0,05	0,00	0,08	0,02	48,59	0,00
	Nakon terapije	0,06	0,01	0,11	0,02	38,85	0,00

Tabela 5.2.2. Deskriptivni statistički parametri bele krvne slike u kontrolnoj grupi krava, na početku i na kraju ogleda

Kontrolna grupa (n=10)		\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x
Σ Leukociti	Početak ogleda	7,20	4,44	9,85	1,81	25,12	0,57
	Nakon ogleda	7,49	5,05	10,08	1,60	21,40	0,51
Limfociti	Početak ogleda	3,35	1,64	5,35	1,26	37,80	0,40
	Nakon ogleda	3,40	2,19	5,13	0,88	25,88	0,28
PMNL	Početak ogleda	2,77	1,59	4,60	0,96	34,65	0,30
	Nakon ogleda	2,82	1,79	4,02	0,70	24,72	0,22
Monociti	Početak ogleda	0,74	0,29	1,01	0,25	33,96	0,08
	Nakon ogleda	0,89	0,32	1,43	0,40	44,38	0,13
Eozinofilni granulociti	Početak ogleda	0,25	0,05	0,77	0,22	87,89	0,07
	Nakon ogleda	0,31	0,03	0,66	0,25	82,70	0,08
Bazofilni granulociti	Početak ogleda	0,05	0,03	0,10	0,02	37,24	0,01
	Nakon ogleda	0,06	0,03	0,12	0,03	45,36	0,01

Srednje vrednosti za broj elemenata bele krvne loze, neposredno nakon terapije ispoljavaju tendencu blagog pada sedmog dana ogleda. U kontrolnoj grupi se beleži blag porast vrednosti svih analiziranih parametara bele krvne slike (osim za eozinofilne granulocite). Primetne su visoke oscilacije kod većine analiziranih parametara unutar vrednosti za belu krvnu lozu.

Tabela 5.2.3. Statistička značajnost razlika u broju elemenata bele krvne loze ogledne (O) grupe pre (P) i nakon (N) terapije

Ogledna grupa (n=30)		
Kategorija ispitivanja	t-vrednost	p
Σ Leukociti O-P : Σ Leukociti O-N	0,067918	0,946089
Limfociti O-P : Limfociti O-N	0,648644	0,519173
PMNL O-P : PMNL O-N	-1,61159	0,112575
Monociti O-P : Monociti O-N	-0,483073	0,630894
Eozinofilni granulociti O-P : Eozinofilni granulociti O-N	1,038066	0,303623
Bazofili O-P : Bazofili O-N	-1,97727	0,052855

*O-ogledna grupa; P-početak ogleda; N-nakon ogleda
p=statistička značajnost na osnovu t testa nezavisnih uzoraka*

Tabela 5.2.4. Statistička značajnost razlika u broju elemenata bele krvne loze kontrolne (K) grupe pre (P) i nakon (N) terapije

Kontrolna grupa (n=10)		
Kategorija ispitivanja	t-vrednost	p
Σ Leukociti K-P : Σ Leukociti K-N	-0,386030	0,703999
Limfociti K-P : Limfociti K-N	-0,110829	0,912978
PMNL K-P : PMNL K-N	-0,128144	0,899456
Monociti K-P : Monociti K-N	-0,996659	0,332141
Eozinofilni granulociti K-P : Eozinofilni granulociti K-N	-0,540693	0,595348
Bazofili K-P : Bazofili K-N	-0,647150	0,525703

*K-kontrolna grupa; P-početak ogleda; N-nakon ogleda
p=statistička značajnost na osnovu t testa nezavisnih uzoraka*

Dobijeni rezultati ukazuju da nije došlo do statistički značajnih promena u vrednostima parametara bele krvne slike pre i nakon terapije vitaminom C (ogledna grupa). Takođe je bela krvna slika u kontrolnoj grupi krava, na početku i na kraju ogleda ostala praktično nepromenjena ($p > 0,05$).

Usled visokih oscilacija u vrednostima za ukupan broj limfocita, monocita, eozinofilnih i bazofilnih granulocita, ne postoji ni približna naznaka pojave statističke značajnosti, niti konkretnog efekta na promenu parametara bele krvne slike nakon terapije vitaminom C. Sve analizirane vrednosti parametara bele krvne slike su bile u fiziološkim granicama.

U tabelama 5.2.5, 5.2.6 i 5.2.7. prikazane su srednje vrednosti i SD, kao i vrednosti ostalih parametara deskriptivne statistike za relativnu leukocitarnu formulu krava pre i nakon terapije vitaminom C, odnosno, na početku i na kraju ogleda.

Statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima parametara leukocitarne formule krava obe grupe data je u tabeli 5.2.8.

Tabela 5.2.5. Uporedni prikaz srednjih vrednosti i SD registrovanih ispitivanjem leukocitarne formule krava (% odnos između pojedinih vrsta belih krvnih zrnaca) pre i nakon terapije preparatom vitaminom C (ogledna grupa, n=30; kontrolna grupa, n=10)

Kategorija Ispitivanja	Ispitivane grupe	Period uzorkovanja	
		Početak ogleda	Nakon ogleda
PMNL (%)	Ogledna grupa	45,28 ± 10,71	41,25 ± 13,80
	Kontrolna grupa	45,75 ± 10,43	45,16 ± 4,10
Limfociti (%)	Ogledna grupa	39,75 ± 8,98	43,06 ± 10,77
	Kontrolna grupa	39,02 ± 10,33	37,72 ± 5,79
Monociti (%)	Ogledna grupa	10,41 ± 5,34	11,86 ± 11,36
	Kontrolna grupa	10,60 ± 3,53	12,27 ± 5,62
Eozinofilni granulociti (%)	Ogledna grupa	3,82 ± 3,97	3,01 ± 3,44
	Kontrolna grupa	3,39 ± 2,72	3,82 ± 3,22
Bazofili (%)	Ogledna grupa	0,66 ± 0,35	0,77 ± 0,32
	Kontrolna grupa	0,74 ± 0,16	0,82 ± 0,29

Srednje vrednosti za procentualni udeo PMNL u oglednoj grupi ukazuje na blagi pad, dok je kod limfocita obrnut odnos, neposredno nakon terapije vitaminom C. U kontrolnoj grupi, ove vrednosti su vrlo slične na početku i na kraju ogleda.

Tabela 5.2.6. Deskriptivni statistički parametri leukocitarne formule ogledne grupe krava, na početku i na kraju ogleda

Ogledna grupa (n=30)		\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x
PMNL (%)	Početak terapije	45,28	24,30	66,62	10,71	23,66	1,99
	Nakon terapije	41,25	4,90	60,80	13,80	33,46	2,52
Limfociti (%)	Početak terapije	39,75	22,80	65,26	8,98	22,58	1,67
	Nakon terapije	43,06	27,40	62,40	10,77	25,01	1,97
Monociti (%)	Početak terapije	10,41	2,28	20,40	5,34	51,32	0,99
	Nakon terapije	11,86	1,30	56,60	11,36	95,83	2,07
Eozinofilni gran. (%)	Početak terapije	3,82	0,10	13,30	3,97	103,82	0,74
	Nakon terapije	3,01	0,40	16,40	3,44	114,28	0,63
Bazofilni gran. (%)	Početak terapije	0,66	0,03	1,40	0,35	52,39	0,06
	Nakon terapije	0,77	0,10	1,60	0,32	42,21	0,06

Tabela 5.2.7. Deskriptivni statistički parametri leukocitarne formule kontrolne grupe krava, na početku i na kraju ogleda

Kontrolna grupa (n=10)		\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x
PMNL (%)	Početak ogleda	45,75	24,80	65,70	10,43	22,79	3,30
	Nakon ogleda	45,16	38,50	51,40	4,10	9,09	1,30
Limfociti (%)	Početak ogleda	39,02	19,50	59,20	10,33	26,48	3,27
	Nakon ogleda	37,72	28,70	44,50	5,79	15,34	1,83
Monociti (%)	Početak ogleda	10,60	3,90	16,70	3,53	33,28	1,12
	Nakon ogleda	12,27	4,70	19,70	5,62	45,82	1,78
Eozinofilni gran. (%)	Početak ogleda	3,39	0,80	9,50	2,72	80,29	0,86
	Nakon ogleda	3,82	0,50	9,70	3,22	84,25	1,02
Bazofilni gran. (%)	Početak ogleda	0,74	0,50	1,00	0,16	21,32	0,05
	Nakon ogleda	0,82	0,50	1,50	0,29	35,34	0,09

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

Tabela 5.2.8 a. Statistička značajnost razlika u parametrima leukocitarne formule ogledne (O) grupe krava, pre (P) i nakon (N) terapije vitaminom C

Ogledna grupa		
Kategorija ispitivanja	t-vrednost	p
PMNL O-P : PMNL O-N	1,248037	0,217120
Limfociti O-P : Limfociti O-N	-1,27767	0,206545
Monociti O-P : Monociti O-N	-0,621589	0,536691
Eozinofilni granulociti O-P : Eozinofilni granulociti O-N	0,841851	0,403390
Bazofili O-P : Bazofili O-N	-1,21674	0,228717

*O-ogledna grupa; P-početak ogleda; N-nakon ogleda
p=statistička značajnost na osnovu t testa nezavisnih uzoraka*

Tabela 5.2.8 b. Statistička značajnost razlika u parametrima leukocitarne formule kontrolne (K) grupe krava, pre (P) i nakon (N) terapije vitaminom C

Kontrolna grupa		
Kategorija ispitivanja	t-vrednost	p
PMNL K-P : PMNL K-N	0,166510	0,869612
Limfociti K-P : Limfociti K-N	0,347110	0,732534
Monociti K-P : Monociti K-N	-0,795678	0,436587
Eozinofilni granulociti K-P : Eozinofilni granulociti K-N	-0,322616	0,750703
Bazofili K-P : Bazofili K-N	-0,766652	0,453227

K-kontrolna grupa; P-početak ogleda; N-nakon ogleda
 p=statistička značajnost na osnovu t testa nezavisnih uzoraka

Analizom dobijenih podataka (tabele 5.2.8.a i 5.2.8.b) nisu ustanovljene statističke značajnosti razlika u procentualnom udelu elemenata bele krvne loze između tretiranih i netretiranih krava preparatom vitamina C u leukocitarnoj formuli u odnosu na početak i kraj tretmana, odnosno, na početku i na kraju ogleda ($p > 0,05$). Međutim, evidentno je da je narušen fiziološki odnos udela PMNL prema limfocitima, čija srednja vrednost za fiziološke granice iznosi 56%:32% u korist limfocita (Jazbec, 1990). Kod ogledne i kontrolne grupe krava ovaj odnos je obrnut usled povećane proizvodnje PMNL i istovremenog odliva ćelija ka mlečnoj žlezdi ili drugim mestima upale u ranoj fazi laktacije-puerperijuma. U krvi je apsolutni broj limfocita bio niži. Ovi nalazi ukazuju da se verovatno radilo o subakutnoj, latentnoj infekciji mlečne žlezde kojoj su, inače, ove dve grupe krava i pripadale. Slične efekte daje i upala materice u ranoj fazi nakon teljenja.

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

Deskriptivni statistički parametri elemenata crvene krvne slike krava, u zavisnosti od tretmana (tretirane/netretirane), pre i nakon primene preparata vitamina C, prikazani su u tabelama 5.2.9 i 5.2.10. Ocena statističke značajnosti utvrđenih razlika u srednjim vrednostima data je u tabelama 5.2.11. i 5.2.12.

Tabela 5.2.9. Srednje vrednosti i SD za parametre crvene krvne slike krava pre i nakon tretmana (Ogledna grupa; n=30), odnosno, na početku i na kraju ogleda (Kontrolna grupa; n=10)

Kategorija Ispitivanja	Ispitivane grupe	Period uzorkovanja	
		Početak ogleda	Nakon ogleda
Er. ($\times 10^{12}/L$)	Ogledna grupa	5,77 \pm 0,98	6,07 \pm 0,79
	Kontrolna grupa	5,69 \pm 0,72	5,70 \pm 0,79
HGB (g/L)	Ogledna grupa	82,40 \pm 12,90	88,2 \pm 11,5
	Kontrolna grupa	82,26 \pm 12,20	81,10 \pm 13,30
HCT (%)	Ogledna grupa	25,52 \pm 2,98	26,67 \pm 2,32
	Kontrolna grupa	24,79 \pm 3,07	24,40 \pm 3,61
MCV (fL)	Ogledna grupa	45,22 \pm 4,06	44,82 \pm 5,20
	Kontrolna grupa	43,66 \pm 4,13	42,93 \pm 2,69
MCH (pg)	Ogledna grupa	14,57 \pm 1,88	14,62 \pm 1,40
	Kontrolna grupa	14,48 \pm 1,15	14,23 \pm 1,20
MCHC (g/dL)	Ogledna grupa	32,27 \pm 3,32	33,02 \pm 3,05
	Kontrolna grupa	33,24 \pm 1,85	33,15 \pm 1,46
RDW (%)	Ogledna grupa	20,24 \pm 3,16	18,85 \pm 2,07
	Kontrolna grupa	19,58 \pm 1,86	19,75 \pm 1,67

Legenda: Er - ukupan broj eritrocita ($\times 10^{12}/L$); HGB - koncentracija hemoglobina (g/L), HCT - hematokritska vrednost (%); MCV - prosečna zapremina eritrocita (fL); MCH - prosečna apsolutna količina hemoglobina u eritrocitu (pg); MCHC - prosečna relativna koncentracija hemoglobina u eritrocitu (g/dL); RDW - distribucija različitih veličina eritrocita (%).

Tabela 5.2.10. Deskriptivni statistički parametri crvene krvne slike u oglednoj (O) grupi krava, pre (P) i nakon (N) terapije i statistička značajnost razlika između srednjih vrednosti

Ogledna grupa	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S _x	p
Er.-O-P	5,77	3,37	8,25	0,98	16,96	0,18	0,195691
Er.-O-N	6,07	4,59	7,44	0,79	12,98	0,14	
HGB-O-P	8,24	5,90	9,90	1,29	15,70	0,24	0,075573
HGB-O-N	8,82	6,50	10,30	1,15	12,99	0,21	
HCT-O-P	25,52	16,90	29,60	2,98	11,66	0,55	0,100772
HCT-O-N	26,67	22,40	30,60	2,32	8,69	0,42	
MCV-O-P	45,22	39,10	53,60	4,06	8,98	0,75	0,743233
MCV-O-N	44,82	38,60	65,40	5,20	11,59	0,95	
MCH-O-P	14,57	10,60	18,00	1,88	12,90	0,35	0,906140
MCH-O-N	14,62	11,40	17,00	1,40	9,61	0,26	
MCHC-O-P	32,27	23,60	35,50	3,32	10,29	0,62	0,371173
MCHC-O-N	33,02	27,10	35,80	3,05	9,23	0,56	
RDW-O-P	20,24	16,40	28,20	3,16	15,63	0,59	
RDW-O-N	18,85	15,80	24,90	2,07	10,97	0,38	0,049569

O-ogledna grupa; P-početak ogleda; N-nakon ogleda
p=statistička značajnost na osnovu t testa nezavisnih uzoraka

Tabela 5.2.11. Deskriptivni statistički parametri crvene krvne slike u kontrolnoj (K) grupi krava, pre (P) i nakon (N) terapije i statistička značajnost razlika između srednjih vrednosti

Kontrolna grupa	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x	p
Er.-K-P	5,69	4,78	6,88	0,72	12,58	0,23	0,993004
Er.-K-N	5,70	4,86	7,15	0,79	13,88	0,25	
HGB-K-P	8,26	6,60	10,20	1,22	14,75	0,39	0,795185
HGB-K-N	8,11	6,10	10,30	1,33	16,34	0,42	
HCT-K-P	24,79	20,90	29,20	3,07	12,39	0,97	0,797487
HCT-K-N	24,40	19,90	30,70	3,61	14,78	1,14	
MCV-K-P	43,66	37,10	52,60	4,13	9,45	1,30	0,644867
MCV-K-N	42,93	37,00	45,20	2,69	6,26	0,85	
MCH-K-P	14,48	12,40	15,80	1,15	7,93	0,36	0,639740
MCH-K-N	14,23	12,00	15,30	1,20	8,43	0,38	
MCHC-K-P	33,24	30,00	35,30	1,85	5,57	0,59	0,905237
MCHC-K-N	33,15	30,40	34,60	1,46	4,40	0,46	
RDW-K-P	19,58	16,00	23,60	1,86	9,51	0,59	0,832262
RDW-K-N	19,75	16,60	23,40	1,67	8,46	0,53	

*K-kontrolna grupa; P-početak ogleda; N-nakon ogleda
p=statistička značajnost na osnovu t testa nezavisnih uzoraka*

Primetno je da je većina vrednosti parametara crvene krvne slike na donjoj fiziološkoj granici, što se posebno odnosi na broj eritrocita ($5,77 \pm 0,98$ i $5,69 \pm 0,72 \times 10^{12}/L$ za oglednu i kontrolnu grupu; fiziološka granica je od $5-10 \times 10^{12}/L$); koncentraciju hemoglobina ($82,4 \pm 1,29$ g/L i $82,6 \pm 1,22$ g/L za oglednu i kontrolnu grupu; fiziološka granica je od $80-150 \times 10$ g/L) i hematokritsku vrednost ($25,52 \pm 2,98$ % i $24,79 \pm 3,07$ % za oglednu i kontrolnu grupu; fiziološka granica je od 24-46 %). Istovremeno su oscilacije unutar ispitivanih parametara bile veoma male (koeficijent varijacije do 16%; tabele 5.2.10 i 5.2.11.).

Primenom *t*-testa nisu dokazane statističke značajne razlike u srednjim vrednostima parametara crvene krvne slike krava pre i nakon tretmana vitaminom C, kao ni u kontrolnoj grupi na početku i na kraju ogleda (tabele 5.2.10. i 5.2.11.). Jedina značajnost je ustanovljena na nivou parametra RDW (distribucija različitih veličina eritrocita; $p < 0,05$) u oglednoj grupi.

5.2.3. Trombociti i prosečna zapremina trombocita u kontrolnoj grupi i grupi krava tretiranih vitaminom C

Deskriptivni statistički parametri za trombocite, u zavisnosti od tretmana vitaminom C prikazani su u tabeli 5.2.12, sa ocenom statističke značajnosti utvrđenih razlika srednjih vrednosti. Vrednosti za kontrolnu grupu prikazane su u tabeli 5.2.13.

Tabela 5.2.12. Deskriptivni statistički parametri za broj trombocita i MPV u oglednoj grupi krava, na početku i na kraju terapije vitaminom C

Ogledna grupa		\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x
Trombociti ($\times 10^9/L$)	Početak terapije	413,97	195,00	627,00	103,01	24,88	19,13
	Nakon terapije	381,93	168,00	825,00	114,94	30,10	20,99
MPV (fL)	Početak terapije	5,92	5,10	7,60	0,56	9,39	0,10
	Nakon terapije	6,89	4,90	18,60	3,23	46,84	0,59

Tabela 5.2.13. Deskriptivni statistički parametri za broj trombocita i MPV u kontrolnoj grupi krava, na početku i na kraju terapije vitaminom C

Kontrolna grupa		\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x
Trombociti ($\times 10^9/L$)	Početak oglada	331,60	251,00	631,00	119,62	36,07	37,83
	Nakon oglada	358,00	224,00	755,00	157,42	43,97	49,78
MPV (fL)	Početak oglada	5,96	5,40	6,90	0,53	8,81	0,17
	Nakon oglada	5,74	5,20	6,60	0,52	9,12	0,17

Vrednosti za trombocite su bile u fiziološkim granicama na početku i na kraju tretmana, uz umerene oscilacije. U oglednoj grupi je došlo do manjeg pada vrednosti (sa $413,97 \pm 103,01$ na $381,93 \pm 114,94 \times 10^9/L$), dok je u kontrolnoj došlo do porasta (sa $331,60 \pm 119,62$ na $358,00 \pm 157,42 \times 10^9/L$).

Tabela 5.2.14. Statistička značajnost razlika u broju trombocita i njihovoj zapremini kod krava kontrolne (n=30) i ogledne grupe (n=10), na početku i na kraju oglada

Kategorija ispitivanja	Ispitivane grupe	t-vrednost	p
Trombociti	Ogledna	1,125924	0,264916
	Kontrolna	-0,42225	0,677838
MPV	Ogledna	-1,59419	0,116425
	Kontrolna	0,938273	0,360525

Primenom *t*-testa nezavisnih uzoraka nije dokazana statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima ispitivanih parametara pre i nakon tretmana visokom dozom vitamina C. Slični rezultati su dobijeni na početku i na kraju ogleda u kontrolnoj grupi (tabela 5.2.14.).

5.3. Rezultati ispitivanja fagocitne sposobnosti i respiratornog praska PMNL i monocita iz krvi krava nakon terapije vitaminom C

5.3.1. Rezultati ispitivanja fagocitne sposobnosti PMNL iz krvi krava nakon terapije vitaminom C

U cilju ispitivanja funkcionalne sposobnosti PMNL i monocita, kao prve odbrambene linije kao odgovor na terapiju sa visokim dozama vitamina C, izvršeno je uporedno ispitivanje krvi ogledne grupe, pre i nakon terapije ovim preparatom. Rezultati su zatim upoređeni sa vrednostima istih parametara registrovanih u kontrolnoj grupi.

U tabelama 5.3.1. 5.3.2. su izneti deskriptivni statistički parametri za procenat PMNL krvi koji su izvršili fagocitozu (jedne ili više bakterija), kao i za intenzitet njihove fluorescence (MFI) u oglednoj i kontrolnoj grupi krava.

Tabela 5.3.1. Deskriptivni statistički parametri i statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima procenta PMNL krvi krava koji su izvršili fagocitozu (jedne ili više bakterija) pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, na početku i na kraju ogleda u kontrolnoj grupi

Ogledna grupa (n=30)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x	<i>p</i>
PMNL (%) - Početak	83,43	66,75	94,98	7,47	8,95	1,36	<i>p</i> <0,001
PMNL (%) - Kraj	90,04	73,26	97,60	6,53	7,26	1,19	
Kontrolna grupa (n=10)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x	<i>p</i>
PMNL (%) -Početak	90,88	86,04	95,99	3,15	3,46	1,00	<i>p</i> >0,05
PMNL (%) - Kraj	90,31	86,10	92,84	2,09	2,32	0,66	

Analizom rezultata prikazanih u tabeli 5.2.15. se može uočiti značajan porast fagocitne aktivnosti PMNL krvi nakon tretmana vitaminom C u pogledu procenta aktiviranih ćelija sa $83,43 \pm 7,47\%$ na $90,04 \pm 7,26\%$, uz mali koeficijent varijacije analiziranog parametra (8,95 % i 7,26 %). Nasuprot ovom nalazu, vrednosti za fagocitnu aktivnost PMNL krvi u kontrolnoj grupi krava su ostale gotovo identične na početku i na kraju ogleda ($90,88 \pm 3,46\%$ i $90,31 \pm 2,32\%$).

Tabela 5.3.2. Deskriptivni statistički parametri i statistička značajnost razlika u vrednostima prosečnog intenziteta fluorescence (MFI) PMNL krvi krava nakon fagocitoze pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, pre i na kraju oglada u kontrolnoj grupi

Ogledna grupa (n=30)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x	P
PMNL (MFI) - Početak	471,73	257,12	685,84	123,41	26,16	22,53	$p < 0,001$
PMNL (MFI) - Kraj	615,65	125,02	1095,61	218,24	35,45	39,85	
Kontrolna grupa (n=10)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x	P
PMNL (MFI) - Početak	570,10	411,97	803,48	114,86	20,15	36,32	$p > 0,05$
PMNL (MFI) - Kraj	484,90	341,08	600,15	106,05	21,87	33,54	

Slično vrednostima procenta aktiviranih ćelija PMNL krvi u procesu fagocitoze, zabeležen je značajan rast intenziteta fluorescence (MFI) PMNL krvi kojim se reflektuje broj fagocitovanih bakterija nakon terapije vitaminom C. Analizom prikazanih rezultata u tabeli 5.2.16. se može uočiti značajan rast prosečnog indeksa fluorescencije (MFI) sa $471,73 \pm 123,41$ na $615,65 \pm 218,24$. Nasuprot ovom nalazu, vrednosti registrovane u kontrolnoj grupi beleže pad.

U pogledu statističke značajnosti može se zaključiti da su srednje vrednosti procenta PMNL krvi koji su izvršili fagocitocitozu kao i prosečan intenzitet njihove fluorescence (MFI, kao indikator intenziteta fagocitoze) nakon tretmana vitaminom C statistički vrlo značajno više ($p < 0,001$) u poređenju sa vrednostima na početku tretmana. Terapija vitaminom C je istovremeno imala pozitivan i visoko značajan uticaj na fagocitozu PMNL krvi. Posebno se ističe intenzitet fagocitoze PMNL krvi na kraju oglada, u odnosu na iste parametre registrovane u kontrolnoj grupi.

Nasuprot ovim nalazima, u kontrolnoj grupi krava nije došlo do statistički značajnih promena kada se uporede vrednosti na početku i na kraju oglada.

5.3.2. Rezultati ispitivanja fagocitne sposobnosti monocita iz krvi krava nakon terapije vitaminom C

U tabelama 5.3.3. i 5.3.4. su iznete vrednosti deskriptivnih statističkih parametara za procenat monocita krvi koji su izvršili fagocitozu (jedne ili više bakterija), kao i vrednosti intenziteta njihove fluorescence (MFI), u ogleđnoj i kontrolnoj grupi krava.

Tabela 5.3.3. Deskriptivni statistički parametri i statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima procenta monocita krvi koji su izvršili fagocitozu (jedne ili više bakterija) kod krava pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, pre i na kraju oglada u kontrolnoj grupi

Ogledna grupa (n=30)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x	<i>p</i>
Mon (%) - Početak	26,54	16,67	43,45	7,24	27,26	1,32	<i>p</i> <0,001
Mon (%) - Kraj	33,90	19,74	51,72	7,89	23,28	1,44	
Kontrolna grupa (n=10)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x	<i>p</i>
Mon (%) -Početak	36,28	30,13	45,05	4,44	12,25	1,41	<i>p</i> >0,05
Mon (%) - Kraj	37,93	22,19	44,85	6,48	17,08	2,05	

Tabela 5.3.4. Deskriptivni statistički parametri i statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima prosečnog intenziteta fluorescence (MFI) monocita krvi nakon fagocitoze kod krava pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, pre i na kraju oglada u kontrolnoj grupi

Ogledna grupa (n=30)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x	<i>p</i>
Mon (MFI) - Početak	40,35	17,29	70,93	15,50	38,41	2,83	<i>p</i> <0,001
Mon (MFI) - Kraj	57,15	32,27	99,14	17,82	31,18	3,25	
Kontrolna grupa (n=10)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x	<i>p</i>
Mon (MFI) -Početak	76,57	40,93	173,26	42,52	55,53	13,45	<i>p</i> >0,05
Mon (MFI) - Kraj	74,02	45,93	137,87	29,41	39,73	9,30	

Slično PMNL iz krvi, srednje vrednosti procenta aktivnih monocita iz krvi u procesu fagocitoze, kao i intenzitet njihove fagocitoze nakon tretmana vitaminom C, ukazuju na statistički visoko značajan stepen aktivacije ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolnu grupu gde su razlike bile samo numeričke ($p > 0,05$).

U odnosu na PMNL krvi, gde je fagocitoza zabeležena kod oko 90% ćelija, aktivnost monocita se kretala oko 30%, uz višestruko slabiji intenzitet fluorescencije kao indikatora snage ROS (engl. *reactive oxygen species*) reakcije.

5.3.3. Rezultati ispitivanja respiratornog praska PMNL krvi krava nakon terapije vitaminom C

Deskriptivni statistički parametri za procenat PMNL krvi krava koji su izvršili respiratorni prasak, kao i prosečan intenzitet njihove fluorescence (MFI, kao indikator snage ROS reakcije), pre i nakon tretmana vitaminom C, odnosno, na početku i na kraju oglada kontrolne grupe prikazana je u tabelama 5.3.5.i 5.3.6. U istim tabelama je prikazana i statistička ocena značajnosti utvrđenih razlika u srednjim vrednostima.

Tabela 5.3.5. Deskriptivni statistički parametri i statistička značajnost razlika za PMNL krvi koji su izvršili respiratorni prasak kod krava pre i na kraju tretmana vitaminom C (ogledna grupa), odnosno, pre i na kraju oglada u kontrolnoj grupi

Ogledna grupa (n=30)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x	p
PMNL (%) - Početak	38,62	13,02	73,94	16,58	42,95	3,03	$p < 0,05$
PMNL (%) - Kraj	49,00	20,94	85,34	18,83	38,43	3,44	
Kontrolna grupa (n=10)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x	p
PMNL (%) - Početak	32,21	18,94	51,86	11,46	35,56	3,62	$p > 0,05$
PMNL (%) - Kraj	28,06	0,00	49,44	14,20	50,60	4,49	

Analizom ovih podataka je utvrđena statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima procenta PMLN u punoj krvi koji su izvršili respiratorni prasak u grupi tretiranoj C vitaminom ($p < 0,05$). Ovaj porast se kretao od $38,62 \pm 16,58$ % pre tretmana na $49,00 \pm 18,83$ % nakon tretmana.

U kontrolnoj grupi nije ustanovljena statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima ovog parametra, na početku i na kraju oglada ($p > 0,05$), čak je zabeležen umeren pad procenta ROS aktiviranih PMNL.

Za razliku od fagocitne aktivnosti PMNL krvi, koja je bila na visokom nivou (oko 90 % aktiviranih ćelija), procenat ROS aktivnih ćelija je bio znatno niži i kretao se od 32-49 %. Ove vrednosti su niže u odnosu na neke koje navode drugi autori (Mateus i sar., 2002; Milovanović i sar., 2014), odnosno, više od vrednosti dobijenih u radu Moya i sar. (2008) i približne rezultatima koje navode Zerbe i sar. (1996).

Tabela 5.3.6. Deskriptivni statistički parametri i statistička značajnost razlika za prosečan intenzitet fluorescencije (MFI) PMNL krvi nakon respiratornog praska kod krava pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, pre i na kraju oglada u kontrolnoj grupi

Ogledna grupa (n=30)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x	p
PMNL (MFI) - Početak	63,16	21,74	163,51	39,51	62,56	7,21	$p > 0,05$
PMNL (MFI) - Kraj	69,77	29,26	136,92	28,62	41,01	5,22	
Kontrolna grupa (n=10)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x	p
PMNL (MFI) - Početak	43,28	24,28	76,47	16,63	38,41	5,26	$p > 0,05$
PMNL (MFI) - Kraj	37,99	0,00	57,32	19,78	52,08	6,26	

Kao što se vidi iz podataka prikazanih u tabeli 5.3.6., za prosečan intenzitet fluorescence (MFI) kod PMNL krvi nakon respiratornog praska nije utvrđena statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima ovog parametra jedinki ogledne i kontrolne grupe.

5.3.4. Rezultati ispitivanja respiratornog praska monocita iz krvi krava nakon terapije vitaminom C

Deskriptivni statistički parametri procenta monocita krvi koji su izvršili respiratorni prasak, kao i intenzitet njihove fluorescence (MFI, kao indikator snage ROS reakcije), pre i nakon tretmana vitaminom C ili bez tretmana kod kontrolne grupe prikazani su u u tabelama 5.3.7. i 5.3.8. Statistička ocena značajnosti utvrđenih razlika u srednjim vrednostima prikazana je u istim tabelama.

Tabela 5.3.7. Deskriptivni statistički parametri i statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima za monocite krvi (u %) koji su izvršili respiratorni prasak kod krava pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, pre i na kraju oglada u kontrolnoj grupi

Ogledna grupa (n=30)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S _x	<i>p</i>
Mon (%) - Početak	17,96	2,08	55,95	13,83	77,00	2,52	<i>p</i> >0,05
Mon (%) - Kraj	13,59	1,79	39,98	10,76	79,15	1,96	
Kontrolna grupa(n=10)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S _x	<i>p</i>
Mon (%) -Početak	15,90	9,13	25,87	6,04	37,97	1,91	<i>p</i> <0,05
Mon (%) - Kraj	9,12	0,00	21,33	6,42	70,46	2,03	

U oglednoj i kontrolnoj grupi je došlo do pada procenta monocita krvi koji su izvršili respiratorni prasak (sa $17,96 \pm 13,83$ % na $13,59 \pm 10,76$ %, odnosno sa $15,90 \pm 6,04$ % na $9,12 \pm 6,04$ %), s tim da je ovaj pad bio statistički značajan u kontrolnoj grupi (*p*<0,05; tabela 5.2.21).

Tabela 5.3.8. Deskriptivni statistički parametri i statističkim značajnostima za prosečan intenzitet fluorescence (MFI) za monocite krvi nakon respiratornog praska kod krava pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, pre i na kraju oglada u kontrolnoj grupi

Ogledna grupa (n=30)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S _x	<i>p</i>
Mon (MFI) - Početak	20,29	1,03	79,56	20,61	101,58	3,76	<i>p</i> <0,05
Mon (MFI) - Kraj	11,92	1,32	41,23	9,95	83,46	1,82	
Kontrolna grupa(n=10)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S _x	<i>p</i>
Mon (MFI) -Početak	15,39	6,81	27,11	7,26	47,21	2,30	<i>p</i> <0,05
Mon (MFI) - Kraj	8,04	0,00	20,77	6,27	77,94	1,98	

Slično negativnom trendu u procentu ROS aktivisanih monocita krvi, iz tabele 5.3.8. se može uočiti statistički značajan pad prosečnog intenziteta fluorescence (MFI) kod monocita krvi i u ogleđnoj i kontrolnoj grupi krava ($p < 0,05$). Dobijene vrednosti reakcija respiratornog praska monocita krvi su višestruko niže u odnosu na vrednosti respiratornog praska PMNL krvi.

5.4. Rezultati ispitivanja funkcionalne aktivnosti polimorfonuklearnih leukocita i monocita iz mleka krava nakon terapije vitaminom C

5.4.1. Rezultati ispitivanja fagocitne sposobnosti PMNL iz mleka krava nakon terapije vitaminom C

U tabelama 5.4.1. i 5.4.2. su prikazani deskriptivni statistički parametri za procenat PMNL iz mleka krava koji su izvršili fagocitozu, kao i prosečan intenzitet njihove fluorescence (MFI) na početku i na kraju ogleđa. Statistička ocena značajnosti utvrđenih razlika između srednjih vrednosti prikazana je u istim tabelama.

Tabela 5.4.1. Deskriptivni statistički parametri i statističkim značajnost razlika usrednjim vrednostima procenta PMNL mleka koji su izvršili fagocitozu (jedne ili više bakterija) kod krava, pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, na početku i na kraju ogleđa u kontrolnoj grupi

Ogledna grupa (n=30)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x	p
PMNL (%) - Početak	1,74	0,00	10,67	2,57	147,33	0,47	$p < 0,05$
PMNL (%) - Kraj	4,20	0,00	17,31	5,03	119,68	0,92	
Kontrolna grupa (n=10)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x	p
PMNL (%) - Početak	2,92	0,91	9,25	2,62	89,69	0,87	$p > 0,05$
PMNL (%) - Kraj	8,15	1,75	22,73	7,20	88,37	2,40	

Tabela 5.4.2. Deskriptivni statistički parametri i statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima prosečnog intenziteta fluorescence (MFI) PMNL mleka nakon fagocitoze kod krava pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, na početku i na kraju ogleđa u kontrolnoj grupi

Ogledna grupa	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x	p
PMNL (MFI) - Početak	0,42	0,00	1,91	0,55	130,27	0,10	$p < 0,05$
PMNL (MFI) - Kraj	1,68	0,00	14,66	2,85	169,98	0,52	
Kontrolna grupa	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x	p
PMNL (MFI) - Početak	2,31	0,26	12,12	3,75	162,13	1,25	$p > 0,05$
PMNL (MFI) - Kraj	4,91	0,74	14,82	4,82	98,25	1,61	

U tabelama 5.4.1. i 5.4.2. se zapaža da postoji statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima fagocitne aktivnosti i intenziteta fagocitoze PMNL (MFI) iz uzoraka mleka u ogleđnoj grupi ($p < 0,05$). Međutim, ove vrednosti su bile veoma niske, sa velikim individualnim varijacijama, te ih treba analizirati sa izvesnom rezervom. Mora se napomenuti da je kod 9 od 30 uzoraka iz ogleđne grupe (30%), izostala fagocitna aktivnost na testu izvedenom protočnom citometrijom. To nije bio slučaj sa PMNL iz mleka plotkinja kontrolne grupe, ali su vrednosti takođe bile vrlo niske.

5.4.2. Rezultati ispitivanja fagocitne sposobnosti monocita iz mleka krava nakon terapije vitaminom C

Fagocitna sposobnost monocita mleka je bila izrazito slaba, odnosno, izostala je kod 90% (27/30) uzoraka ogleđne grupe. Kod prestalih 10% uzoraka (3/30) ona je bila ispod 1%. Ukupna fagocitoza monocita iz mleka je zabeležena samo kod 0,03% ćelija na početku ogleđa i 0,11% ćelija na kraju ogleđa, posle tretmana vitaminom C. Slični rezultati su registrovani i u kontrolnoj grupi tako da zbog toga ovi podaci nisu razmatrani u daljem radu.

5.4.3. Rezultati ispitivanja respiratornog prasaka PMNL iz mleka krava nakon terapije vitaminom C

Nasuprot fagocitozi, proces stvaranja reaktivnih oksida u PMNL mleka nije bio ometen jer se verovatno radi o rezultatu jedinstvenog procesa ćelijske smrti (engl. *neutrophil extracellular traps*, NETs) koji se odlikuje pozitivnom ROS reakcijom (pre svega kod PMNL), uz slabu detekciju reakcije fagocitoze postupkom protočne citometrije.

Deskriptivni statistički parametri dobijenih rezultata za PMNL mleka koji su izvršili respiratorni prasak, kao i prosečan intenzitet njihove fluorescence (MFI, kao indikator snage ROS reakcije), pre i nakon tretmana vitaminom C, odnosno, pre i nakon ogleđa u kontrolnoj grupi, prikazani su u tabeli 5.4.3. U istoj tabeli je prikazana i statistička ocena značajnosti utvrđenih razlika.

Tabela 5.4.3. Deskriptivni statistički parametri i statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima za PMNL mleka (u %) koji su izvršili respiratorni prasak kod krava pre i na kraju tretmana sa vitaminom C, odnosno, pre i na kraju oglada u kontrolnoj grupi

Ogledna grupa (n=30)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x	P
PMNL (%) - Početak	25,58	1,52	96,74	22,84	89,26	4,17	p>0,05
PMNL (%) - Kraj	33,45	1,52	82,78	27,15	81,16	4,96	
Kontrolna grupa (n=10)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x	P
PMNL (%) -Početak	30,91	0,00	80,00	25,18	81,46	7,96	p>0,05
PMNL (%) - Kraj	43,79	0,00	89,51	32,79	74,89	10,37	

Iz prikazanih rezultata može da se zapazi da nisu utvrđene statističke značajne razlike u srednjim vrednostima procenta PMNL mleka između ogledne i kontrolne grupe krava, koji su reagovali respiratornim praskom (p>0,05). Kod obe grupe se zapaža povećanje procenta ćelija koje su pozitivno reagovala, ali su ove vrednosti bez statističke značajnosti usled visokih varijacija.

U tabeli 5.4.4. su prikazani deskriptivni statistički parametri za intenzitet fluorescence (MFI, kao indikator snage ROS reakcije) nakon respiratornog praska, pre i nakon tretmana vitaminom C, ili bez tretmana u kontrolnoj grupi. U istoj tabeli je prikazana i ocena statističke značajnosti utvrđenih razlika.

Tabela 5.4.4. Deskriptivni statistički parametri i statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima prosečnog intenziteta fluorescence (MFI) za PMNL mleka krava nakon respiratornog praska pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, pre i na kraju oglada u kontrolnoj grupi

Ogledna grupa (n=30)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x	p
PMNL (MFI) - Početak	59,80	2,82	348,28	69,88	116,85	12,76	p>0,05
PMNL (MFI) - Kraj	73,62	2,89	174,17	48,38	65,71	8,83	
Kontrolna grupa (n=10)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S_x	p
PMNL (MFI) -Početak	77,90	33,90	182,10	50,64	65,01	16,88	p>0,05
PMNL (MFI) - Kraj	154,78	29,04	429,59	123,67	79,90	41,22	

Slično kao i kod procenta PMNL mleka koji su reagovali respiratornim praskom, nisu utvrđene statističke značajnosti ni u intenzitetu respiratornog praska (MFI) između ogledne i kontrolne grupe (p>0,05). U ovom slučaju se takođe beleži porast vrednosti u oglednoj i kontrolnoj grupi na kraju tretmana (ogleda), ali su vrednosti ispoljavale visok stepen oscilacija.

5.4.4. Rezultati ispitivanja respiratornog prasaka monocita iz mleka krava nakon terapije vitaminom C

U tabelama 5.4.5. i 5.4.6. su iznete srednje vrednosti za procenat monocita mleka koji su izvršili respiratorni prasak, kao i za prosečan intenzitet njihove fluorescence (MFI, kao indikator snage ROS reakcije), u ogednoj i kontrolnoj grupi krava, sa statističkom ocenom značajnosti utvrđenih razlika.

Tabela 5.4.5. Deskriptivni statistički parametri i statistička značajnost razlika u procentu monocita iz mleka krava koji su izvršili respiratorni prasak pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, pre i na kraju ogeda u kontrolnoj grupi

Ogedna grupa (n=30)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S _x	<i>p</i>
Mon (MFI) - Početak	28,72	0,00	89,47	27,50	95,75	5,02	p>0,05
Mon (MFI) - Kraj	36,26	0,96	95,95	32,50	89,64	5,93	
Kontrolna grupa (n=10)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S _x	<i>p</i>
Mon (MFI) -Početak	30,67	0,00	80,00	25,22	82,25	7,98	p>0,05
Mon (MFI) - Kraj	43,79	0,00	89,51	32,79	74,89	10,37	

Može se zapaziti da ove vrednosti imaju tendencu rasta na kraju ogeda, odnosno, na kraju tretmana vitaminom C. Međutim, utvrđene razlike su bile samo numeričke, bez statističke značajnosti (p>0,05).

Za razliku od PMNL mleka, monociti ispoljavaju dvostruko manju aktivnost ćelija u ROS reakciji. U kontrolnoj grupi, PMNL su imali 73,62% ROS aktiviranih ćelija, dok je ova vrednost kod monocita bila 36,26% na kraju tretmana vitaminom C.

Tabela 5.4.6. Deskriptivni statistički parametri i statistička značajnost razlika u prosečnom intenzitetu fluorescence (MFI) monocita mleka krava, pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, pre i na kraju ogeda u kontrolnoj grupi

Ogedna grupa (n=30)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S _x	<i>p</i>
Mon (MFI) - Početak	34,11	0,00	196,59	41,47	121,55	7,57	p>0,05
Mon (MFI) - Kraj	50,20	0,53	174,17	47,82	95,25	8,73	
Kontrolna grupa (n=10)	\bar{x}	Min.	Maks.	SD	CV%	S _x	<i>P</i>
Mon (MFI) -Početak	70,19	0,00	182,10	53,73	76,54	16,99	p>0,05
Mon (MFI) - Kraj	139,31	0,00	429,59	126,45	90,77	39,99	

Slično rezultatima prikazanim u tabeli 5.4.5., kod krava pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, pre i na kraju oglada u kontrolnoj grupi, nije bilo statističke značajnosti u intenzitetu respiratornog praska (MFI) monocita mleka ($p > 0,05$). Razlike su bile samo numeričke, u korist vrednosti registrovanih na kraju oglada.

6. DISKUSIJA

U okviru ovog poglavlja su razmotreni rezultati dobijeni ispitivanjem uticaja vitamina C na kvalitet mleka ocenjen CM testom, pre i nakon aplikacije visokih doza vitamina C, bakterioloških nalaza mleka CMT pozitivnih četvrti na početku i na kraju ogleda, u zavisnosti od tretmana vitaminom C, vrednosti kompletne krvne slike i leukograma krava kao i stepena funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita (fagocitoza i respiratorni prasak) iz pune krvi i mleka CMT pozitivnih (++, +++) krava u periodu od 10 do 30 dana posle teljenja, pre i nakon tretmana vitaminom C (ogledna grupa), odnosno, na početku i na kraju ogleda u kontrolnoj grupi (bez tretmana).

Posebna pažnja je, u ovom poglavlju, posvećena analizi stepena statističke značajnosti utvrđenih razlika između srednjih vrednosti registrovanih u oglednoj i kontrolnoj grupi. Ti rezultati su zatim upoređeni sa rezultatima drugih autora koji su se bavili ovom problematikom.

Radi bolje preglednosti, poglavlje diskusija je podeljeno u više potpoglavlja, u skladu sa postavljenim istraživačkim zadacima.

6.1. CM test, mikrobiološke analize mleka i broj somatskih ćelija u kontrolnoj i oglednoj grupi krava (pre i nakon terapije vitaminom C)

Promene u mleku obolelih četvrti se odnose na promenu boje, prisustvo ugrušaka i naročito, povećanog broja leukocita, što se smatra najobjektivnijim parametrom u dijagnostici mastitisa, definišući ga kao oboljenje sa povećanim brojem leukocita u svežem mleku poreklom iz obolele četvrti. Ovo uvećanje se javlja kao reakcija tkiva na insult, sa prethodnim promenama u mleku, koje su posledica oštećenja tkiva (Radostits i sar., 1994; Hristov i sar., 1997).

6.1.1. Rezultati CM testa u uzorcima mleka svih grla u ogledu

Može se konstatovati da se, od svega navedenog, do pouzdanog i vrednog rezultata može doći jedino ukoliko se razrade metode celokupne kontrole i zdravstvene zaštite vimena. Osnova te kontrole leži u individualnoj kontroli zdravlja vimena svake krave (Jakovac i Mašek, 1971).

Klinički mastitisi nisu problem u dijagnostičkom smislu, zbog ispoljavanja jasnih simptoma, ali su veliki problem supklinički mastitisi. Najčešće metode koje se koriste u dijagnostici ovih mastitisa su *White Side test* i *CMT test* (Kalifornija mastitis test, Šalmov test) (Sharma i sar., 2011; Magaš, 2012).

Granični nivoi ovih testova zavise od lokalnih uslova i važećih državnih propisa, a najčešće se kao granica navodi 3×10^5 somatskih ćelija u 1 mL mleka, mada se i ona stalno smanjuje u razvijenim zemljama (Hristov, 2002). Istovremeno, treba primeniti i predmuzne probe, kojima bi se ustanovilo da li postoji neki poremećaj u sekreciji mleka.

Tabela 6.1.1. Određivanje broja leukocita na osnovu rezultat CM testa

Reakcija	Broj leukocita u mL mleka
Negativna	- (ispod 200 000 leukocita, bez promena u konzistenciji);
sumnjiva	± (do 550 000 leukocita, neznatna promena u konzistenciji);
slabo pozitivna	+ (do 1 500 000 leukocita, postepeno zgrušavanje mleka);
izrazito pozitivna	++ (do 5 000 000 leukocita, momentalno zgrušavanje mleka);
jako pozitivna	+++ (preko 5 000 000 leukocita, stvara se želatinozna masa).

U ogledu, sprovedenom u okviru ove disertacije, je vršena 5-dnevna aplikacija visokih doza vitamina C (25mg/kg TM, SC). Kontrola je obavljena nakon dva dana od poslednje aplikacije. Iz ogleadne grupe, od 30 krava, ukupno je analizirano 36 četvrti, dok je u kontrolnoj grupi od 10 krava, analizirano 12 četvrti. Uspeh izlečenja je određivan izostankom CMT pozitivne reakcije mleka i on je ustanovljen u 66,67 % (24/36) četvrti kod krava tretiranih tokom rane faze laktacije. U kontrolnoj grupi (bez terapije vitaminom C) rezultati su bili slični pre i nakon završenog ogleda. Naresh i sar. (2002) navode da je u njihovom ispitivanju uspeh tretmana vitaminom C iznosio 83,33 % dok u 16,77 % slučajeva nije registrovan uspešan odgovor na terapiju do poslednjeg dana analiza. Ovaj ogled je bio sproveden na uzorku od 12 krava.

Dužina terapije u ogledima drugih autora iznosila je od tri do pet dana: 3 dana IM po 20 mg/kg u ogledu Ranjan-a i sar. (2005) za klinički mastitis a petodnevni tretman, sa po 25 mg/kg za supklinički mastitis (Naresh i sar. 2002). Vitamin C može imati primenu u terapiji upale mlečne žlezde kao injekcioni preparat (IM aplikacija - Ranjan i sar., 2005; SC aplikacija - Naresh i sar., 2002; po 25 mg/kg; IV aplikacija - Imlah, 1961) ili kao dodatak hrani (Weiss i sar., 2007).

6.1.2. Mikrobiološko ispitivanje uzoraka mleka svih grla u ogledu

U tabeli 6.1.2. je dat prikaz rezultata mikrobiološkog ispitivanja pojedinačnih uzoraka mleka iz CMT pozitivnih četvrti grla iz ogledne i kontrolne grupe, sa brojem i procentom izolovanih sojeva bakterija i gljivica.

Tabela 6.1.2. Prikaz rezultata mikrobiološkog ispitivanja pojedinačnih uzoraka mleka iz CMT pozitivnih četvrti grla iz ogledne i kontrolne grupe, sa brojem i procentom izolovanih sojeva bakterija i gljivica

Mikrobiološki nalaz	OGLEDNA GRUPA				KONTROLNA GRUPA			
	POČETAK		KRAJ		POČETAK		KRAJ	
	Broj izolovanih sojeva	Procenat izolovanih sojeva	Broj izolovanih sojeva	Procenat izolovanih sojeva	Broj izolovanih sojeva	Procenat izolovanih sojeva	Broj izolovanih sojeva	Procenat izolovanih sojeva
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	16,00	10	15,15	6	18,18	6	17,65
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7	9,34	6	9,09	3	9,10	4	11,76
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	1,33	0	0	2	6,06	2	5,88
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	3	4,00	0	0	0	0	1	2,94
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	1	1,33	0	0	2	6,06	2	5,88
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	2,67	2	3,03	0	0	0	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	4	5,33	2	3,03	0	0	0	0
<i>Streptococcus uberis</i>	1	1,33	0	0	1	3,03	1	2,94
<i>Corynebacterium bovis</i>	1	1,33	2	3,03	1	3,03	0	0
<i>Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes</i>	4	5,33	3	4,55	1	3,03	1	2,94
<i>Bacillus cereus</i>	2	2,67	0	0	1	3,03	1	2,94
<i>Candida albicans</i>	1	1,33	2	3,03	0	0	0	0
<i>Prototheca sp.</i>	4	5,33	5	7,58	6	18,18	5	14,71
Nepatogeni izolat*	32	42,68	34	51,51	10	30,30	11	32,36
UKUPNO	75	100	66	100	33	100	34	100

*od nepatogene mikroflore, u najvećem broju su izolovane bakterije iz roda *Micrococcus* i roda *Bacillus*

Kao što je već navedeno u poglavlju Rezultati, injekciona aplikacija visokih doza vitamina C, nije dovela do eliminacije patogenih mikroorganizama iz vimena. U mleku krava sa supkliničkim mastitisom, tretiranih visokom dozom vitamina C je ipak došlo do smanjenja broja bakterijskih kolonija za 40,35%, dok je u kontrolnoj grupi ovo smanjenje iznosilo 31,70%. Ukupan broj bakterijskih izolata je takođe bio smanjen u tretiranoj grupi krava u odnosu na kontrolnu grupu (75 : 66 i 33 : 34). U obe grupe krava, dominantni izolati su bili *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* i *Prototheca* kao i apatogeni sojevi iz roda *Micrococcus* i *Bacillus*.

6.1.3. Broj somatskih ćelija u mleku

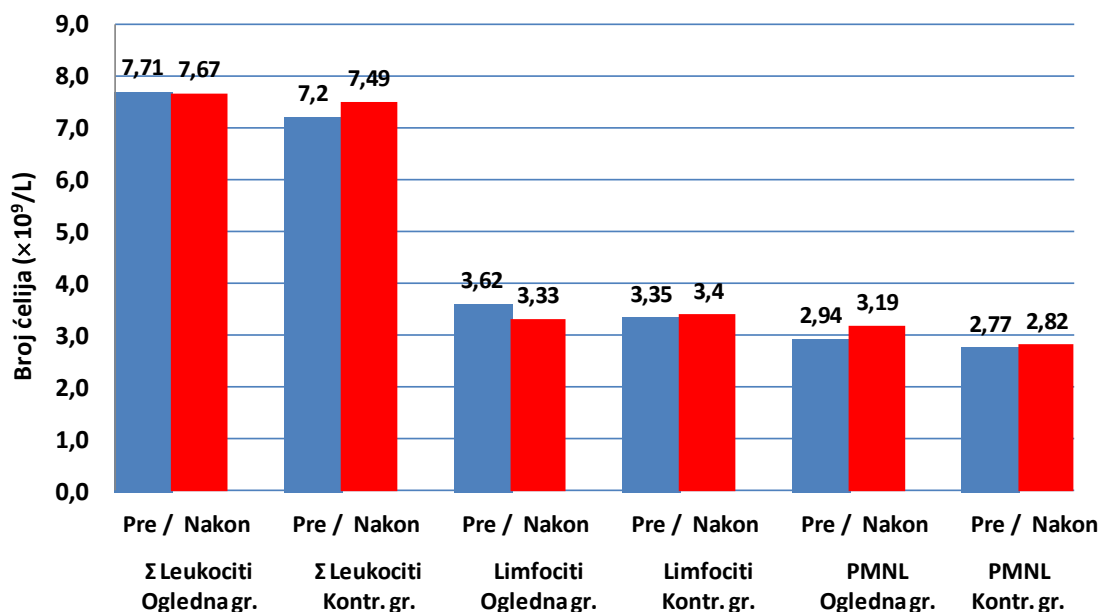
Podaci dobijeni određivanjem broja somatskih ćelija (BSC) u uzorcima mleka prikupljenim iz obolelih četvrti krava (pozitivnih na CMT) na početku oglada kao i po završetku tretmana vitaminom C, prikazani su u tabeli 5.1.4. U grupi krava, koja je kasnije tretirana C vitaminom, najviša registrovana vrednost BSC (u hiljadama) je bila 17 525,00 a najniža 805,00. Prosečne vrednosti BSC su u tretiranoj grupi bile na početku oglada $3\,730,95 \pm 4\,311,26$, a na kraju $1\,299,53 \pm 2\,070,72$. U kontrolnoj grupi plotkinja ove vrednosti su iznosile $4\,812,42 \pm 5\,955,03$ i $3\,287,25 \pm 3\,161,84$ na kraju oglada. Analizom dobijenih rezultata se može zaključiti da je u grupi krava tretiranoj visokim dozama C vitamina došlo do statistički značajnog smanjenja broja BSC ($p < 0,05$) što je bilo u podudarnosti sa rezultatima CMT.

Ukoliko se izvrši podela grla na osnovu izlečenja (odsustvo pozitivnih reakcija na CMT i broj somatskih ćelija u vrednostima oko i ispod 500 000 ćelija/mL mleka), izlečenje je utvrđeno kod 66,67 % slučajeva (24/36 četvrti). U kontrolnoj grupi, od 12 četvrti spontano je došlo do smanjenja broja ćelija samo u jednom slučaju (8,33 %). Ova razlika je takođe bila statistički značajna ($p < 0,05$).

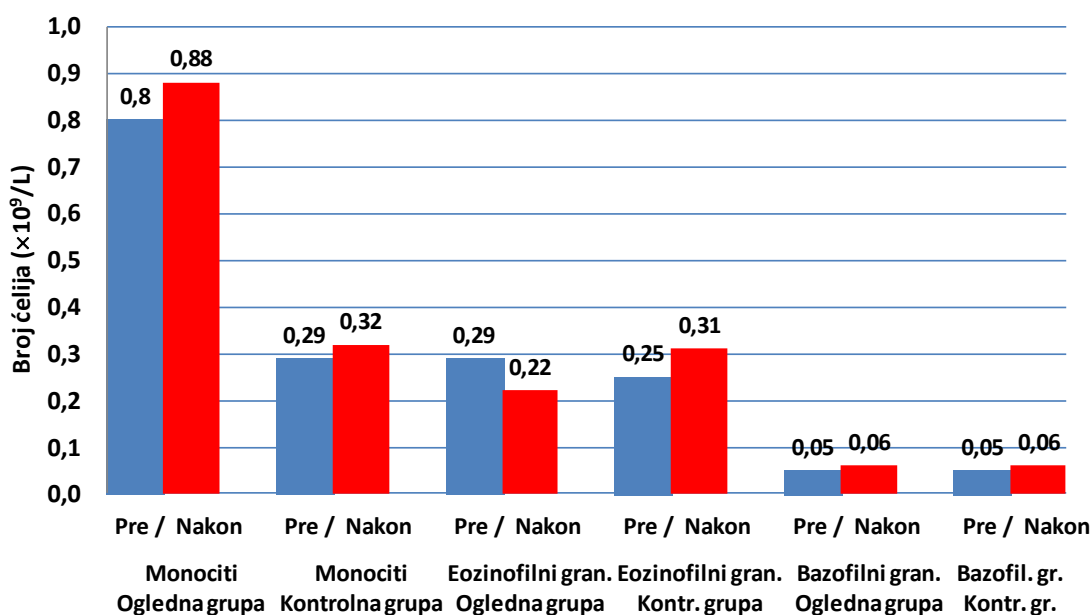
6.2. Hematološki profil nakon terapije vitaminom C

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

Na grafikonima 6.2.1. i 6.2.2 su uporedno prikazane srednje vrednosti za parametre bele krvne slike krava pre i nakon terapije vitaminom C. Statistička ocena značajnosti utvrđenih razlika između srednjih vrednosti pojedinih parametara registrovanih u oglednoj i kontrolnoj grupi plotkinja prikazana je u tabelama 5.2.3 i 5.2.4.



Grafikon 6.2.1. Bela krvna slika krava pre i nakon terapije vitaminom C kod ogledne i na početku i kraju ogleda kod krava u kontrolnoj grupi (Σ Leukociti, Limfociti i PMNL)



Grafikon 6.2.2. Bela krvna slika krava pre i nakon terapije vitaminom C kod ogledne i na početku i kraju ogleda kod krava u kontrolnoj grupi (monociti, eozinofilni granulociti i bazofilni granulociti)

Dinamika promena vrednosti broja belih i krvnih elemenata je vrlo intenzivna u prvih 50-60 dana nakon laktacije. Zbog toga je za tumačenje vrednosti ovih parametara neophodno uzeti u obzir vremenski period kada se ovi parametri analiziraju. U ovom ogledu, prosečno vreme prve analize odgovaralo je $23,14 \pm 3,85$. danu nakon teljenja, dok je ponovljeno

uzorkovanje izvršeno 7 dana kasnije, odnosno, prosečno sa $30,14 \pm 3,85$. dana laktacije (tabela 5.0.2.). S obzirom da analize ovih parametara kontrolišu u momentu visoke metaboličke opterećenosti i "prestrojavanja" organizma, može se zaključiti da se većina vrednosti za ukupan broj leukocita nalazi u fiziološkom opsegu za analizirani period ($4-12 \times 10^9/L$) i da nakon 7 dana nije došlo do značajnijih promena (raspon od $7,2-7,7 \times 10^9/L$). Može se, prema tome zaključiti, da je bela krvna slika u oglednoj i kontrolnoj grupi na početku i na kraju ogleada ostala nepromenjena ($p > 0,05$).

Dinamika promena se može realnije sagledati analizom leukocitne formule: PMNL i monociti su bili u gornjim fiziološkim granicama ($3,3 \times 10^9/L$ i $0,3 \times 10^9/L$), dok su eozinofilni granulociti imali vrednosti preko fiziološke granice koja iznosi $2,4 \times 10^9/L$.

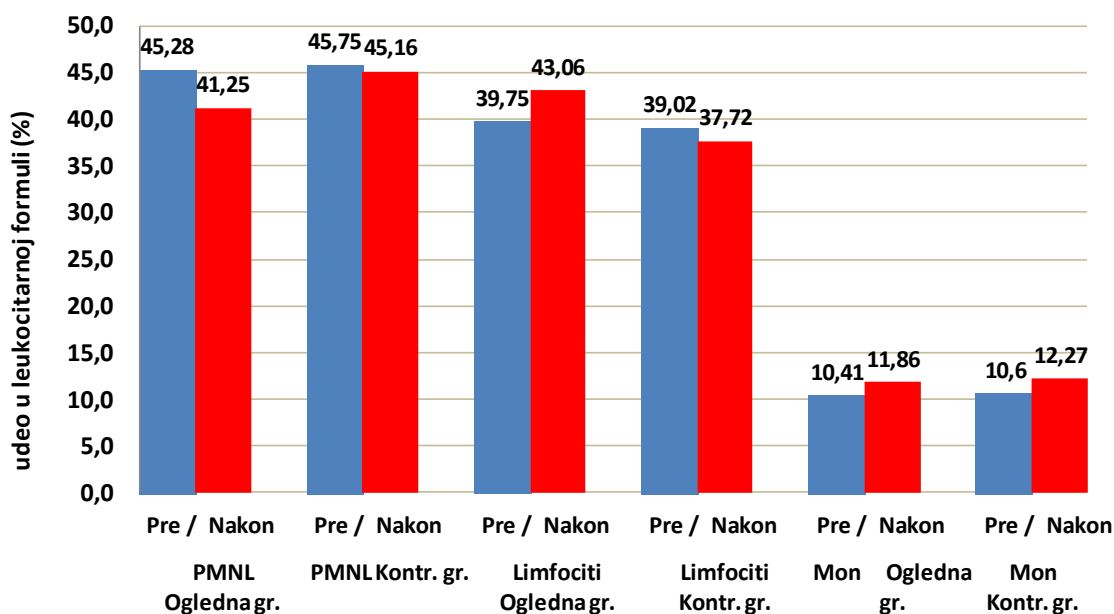
Promene u krvnoj slici krava, neposredno nakon teljenja, nastaju pod uticajem endogenih glukokortikosteroida i praćeno je neutrofilijom i limfopenijom (Naessens i Hobkins, 1996). Smanjenje broja neutrofilnih granulocita rezultira smanjenim odnosom PMNL prema limfocitima. Neutrofilija kod goveda, koja se javlja nakon početnog stadijuma neutropenije, je česta kod blagih i srednje teških inflamatornih procesa i redovno prati ozbiljna zapaljenja nakon povećane produkcije neutrofilnih granulocita u kostnoj srži. U slučajevima hroničnih infekcija javlja se ili neutrofilija ili broj neutrofilnih granulocita ostaje nepromenjen (Lumsden i sar., 1974).

Krave u ogledu su bile odabrane upravo na osnovu činjenice da imaju latentnu ili blagu hroničnu infekciju vimena koja se odlikuje pozitivnim rezultatom CM testa. Ukupan broj leukocita, broj PMNL i limfocita kao i njihov odnos nije se menjao u zavisnosti od tretmana vitaminom C (kontrolna grupa) kao ni pre i nakon terapije (ogledna grupa).

Bez obzira na ove promene, sve analizirane vrednosti parametara bele krvne slike su se kretale u fiziološkim granicama, osim kod eozinofilnih granulocita (povišene vrednosti).

Prema Mateus-u i sar. (2002), vrednosti za PMNL dostižu plato 24. dana posle teljenja, a nakon toga sledi novi pad. Prema Kimu i sar. (2005) i Saad i sar. (1989) svi elementi bele krvne loze beleže pad samo u prvoj nedelji a oporavak je bio kontinuiran u naredne tri nedelje. Joksimović-Todorović i Davidović (2012) su dobile suprotne podatke kod 17 krava holštajn frizijske rase, kod kojih su najviše vrednosti za ukupan broj leukocita, neutrofilnih granulocita i monocita zabeležene na dan teljenja, a zatim su bile u konstantnom padu tako da su najniže vrednosti zabeležene 45. dan nakon teljenja.

Na grafikonu 6.2.3. su prikazane srednje vrednosti parametara relativne leukocitarne formule krava pre i nakon terapije vitaminom C, odnosno, na početku i na kraju ogleada.



Grafikon 6.2.3. Procentualni udeo ćelija u leukocitarnoj formuli i statistička značajnost razlika kod krava (% odnos između pojedinih vrsta belih krvnih zrnaca) pre i nakon terapije preparatom vitamina C (ogledna grupa, n=30; kontrolna grupa, n=10)

Leukogram (pre svega, procentualni odnos limfocita i PMNL), analiziran u prvih 20-30 dana laktacije, sa ili bez izračunatih vrednosti za procenat/intenzitet respiratornog praska, može poslužiti kao nespecifičan indikator postojanja upalnog procesa pri čemu je u puerperijumu najčešći lokus materica (Milovanović, 2014). Neutrofilni granulociti krava sa blažim upalnim procesom (materica i/ili vime) ostaju u cirkulaciji tako da nadmašuju vrednosti procentualnog udela u odnosu na limfocite. Suprotno tome, hemoatraktanti upalnih procesa u slučaju upala (npr. u materici ili vimenu) dovode do povećanja broja leukocita, što je posledica naglog priliva PMNL i seruma iz periferne cirkulacije (Romaniukowa i Rogoziewicz, 1978, 1979), što "prazni" vaskularni pul PMNL iz perifernog krvotoka.

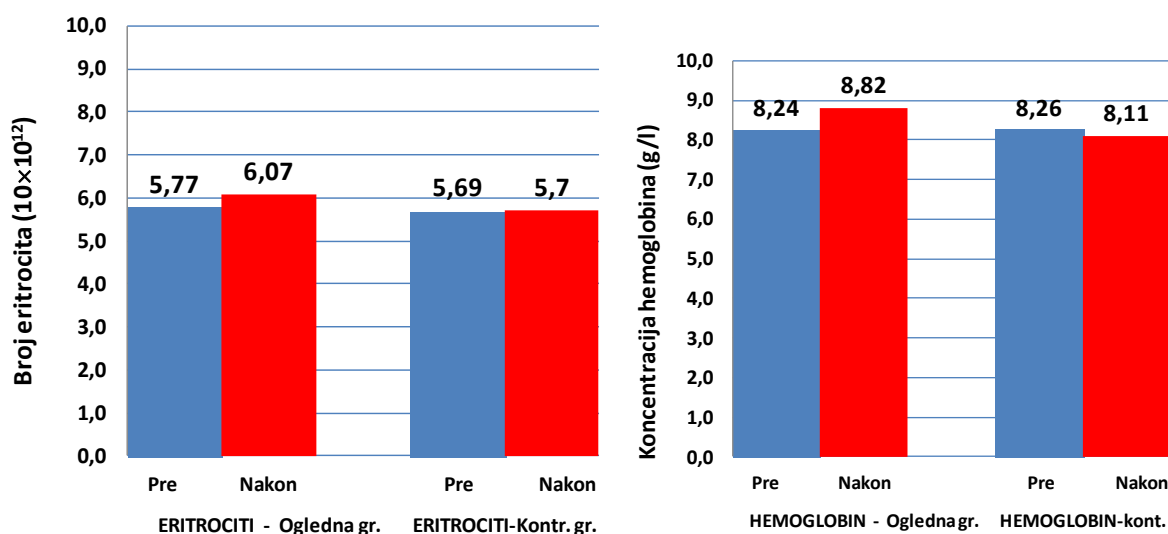
U kontrolnoj grupi, nisu zapažena veća odstupanja u srednjim vrednostima procentualnog udela PMNL, limfocita, monocita, eozinofilnih i bazofilnih granulocita u krvi na kraju ogleda. Ove vrednosti su gotovo identične vrednostima registrovanim na početku ogleda. Inflamatorna neutrofilija se često može zapaziti kod krava sa mastitisom (Aroch i sar., 2003; Lehtolainen i sar., 2003), endokarditisom (Power i Rebhun, 1983) ili hepatitisom (Dore i sar., 2007).

Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da se ukupan broj leukocita, broj PMNL i limfocita kao i njihov odnos nije menjao u zavisnosti od tretmana vitaminom C.

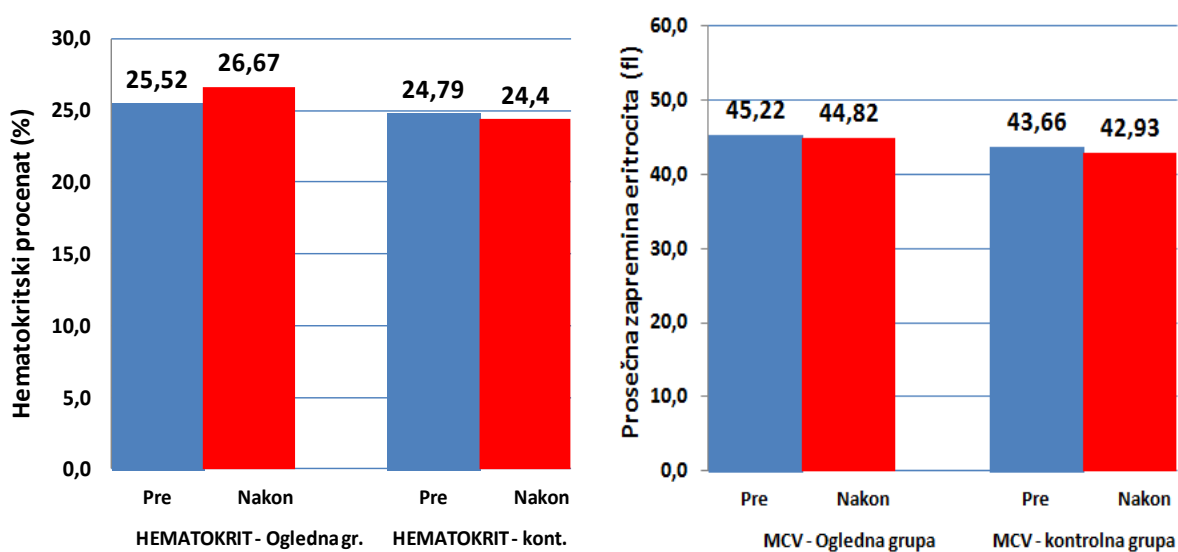
Povišen broj PMNL i leukogram u korist PMNL ukazuje na leukocitozu kod CMT pozitivnih grla u ranoj laktaciji.

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

Promene u crvenoj krvnoj slici pre i posle tretmana vitaminom C prikazane su na grafikonima 6.2.4. i 6.2.5.



Grafikon 6.2.4. Srednje vrednosti parametara crvene krvne slike krava (broj eritrocita i koncentracija hemoglobina) pre i nakon tretmana (ogledna grupa; n=30), odnosno, na početku i na kraju oglada (kontrolna grupa; n=10)



Grafikon 6.2.5. Srednje vrednosti parametara crvene krvne slike krava (hematokritska vrednost i prosečna zapremina eritrocita) pre i nakon tretmana (ogledna grupa; n=30), odnosno, na početku i na kraju oglada (kontrolna grupa; n=10)

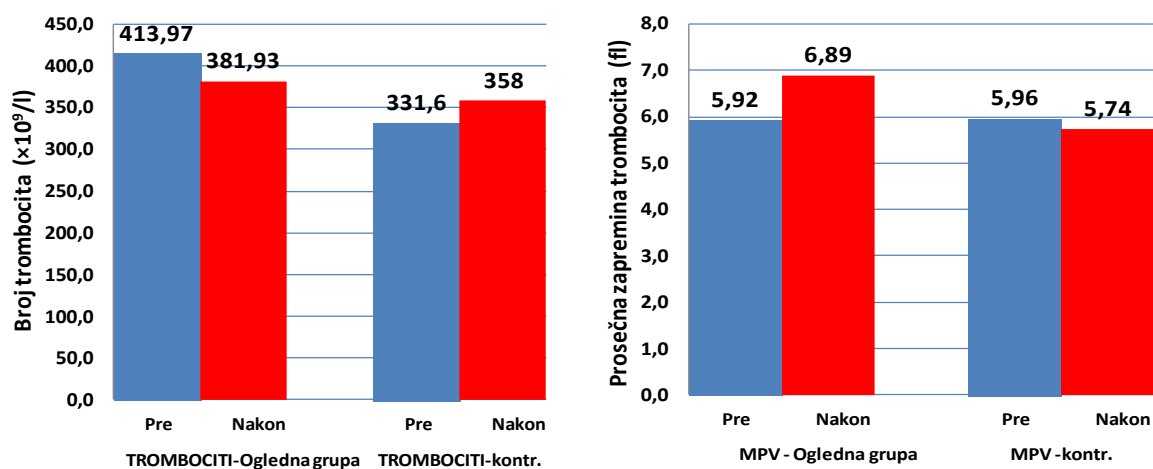
Slično beloj krvnoj slici, kod kontrolne i grupe krava tretirane vitaminom C, nisu dokazane statističke značajne razlike u srednjim vrednostima parametara crvene krvne slike. Kod svih krava uključenih u ispitivanja je registrovan stabilan broj eritrocita, koncentracija hemoglobina i hematokritska vrednost 20. i 30. dana laktacije u oba analizirana perioda.

Može se zaključiti da tretman visokim dozama vitamina C nije imao uticaja na broj eritrocita, koncentraciju hemoglobina, hematokritsku vrednost i druge izvedene parametre crvene krvne slike. Jedina razlika između srednjih vrednosti, koja je bila statistički značajna je ustanovljena za parametar RDW (distribucija veličina eritrocita; $p < 0,05$) u ogednoj grupi.

U dostupnoj literaturi su podaci o toksičnosti vitamina C kod odraslih preživara nakon prekomernog doziranja veoma oskudni. Seifi i sar. (2010) su analizirali uticaj prekomerne suplementacije vitaminom C na hematološke parametare, koncentraciju globulina, vrednosti osnovnih biohemijskih parametara u serumu i prirast teladi rase holštajn. Na osnovu dobijenih rezultata, autori su utvrdili da je broj limfocita (14. dan nakon rođenja) i monocita (30. dan nakon rođenja) bio značajno niži u uslovima prekomernog doziranja askorbinskom kiselinom (ogledna grupa) nego u kontrolnim uslovima. Ove promene nisu uticale na dnevni prirast teladi.

6.2.3. Trombociti i prosečna zapremina trombocita u kontrolnoj grupi i grupi krava tretiranih vitaminom C

Srednje vrednosti broja i zapremine trombocita, u zavisnosti od tretmana vitaminom C prikazani su na grafikonu 6.2.6.



Grafikon 6.2.6. Srednje vrednosti broja i prosečne zapremine trombocita na početku i na kraju ogleda

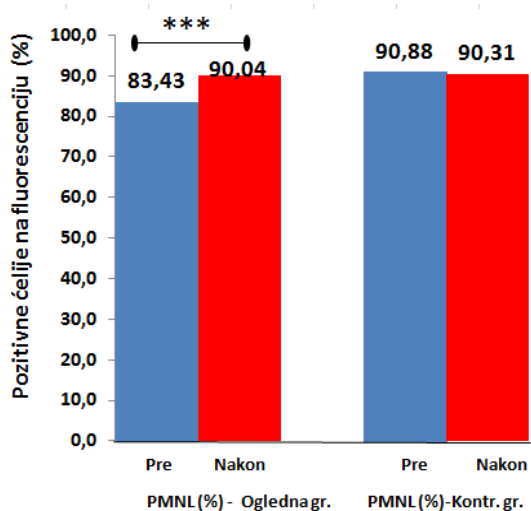
Vrednosti za trombocite su se kretale u fiziološkim granicama na početku i na kraju tretmana, uz umerene oscilacije. Slično drugim parametrima krvi, nije utvrđena statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima parametara broja trombocita i prosečne zapremine trombocita na početku i kraju oglada, odnosno na kraju terapije. Broj trombocita i njihova zapremina su bili u fiziološkim granicama.

6.2. Fagocitna sposobnost i respiratorni prasak PMNL i monocita iz krvi krava nakon primene terapije vitaminom C

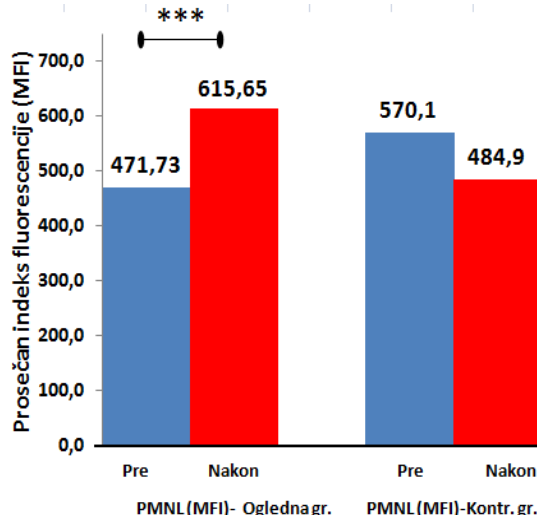
U ovom delu ispitivanja je izvršena procena sistemske reaktivnosti nespecifičnog dela imunskog sistema preko odbrambene funkcije PMNL i monocita iz krvi krava pre i nakon terapije vitaminom C, odnosno, na početku i na kraju oglada bez terapije (kontrolna grupa).

6.2.1. Ispitivanje fagocitne sposobnosti PMNL iz krvi krava nakon terapije C vitaminom

Na grafikonu 6.2.7. su prikazane srednje vrednosti i statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima za procenat PMNL iz krvi koji su izvršili fagocitozu (jedne ili više bakterija), a prosečan intenzitet fluorescencije (MFI) je prikazan na grafikonu 6.2.8., u zavisnosti od aplikacije vitamina C, pre i na kraju oglada.



Grafikon 6.2.7. Srednje vrednosti fagocitne sposobnosti PMNL krvi koji su izvršili fagocitozu (jedne ili više bakterija) kod krava pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, na početku i na kraju oglada u kontrolnoj grupi



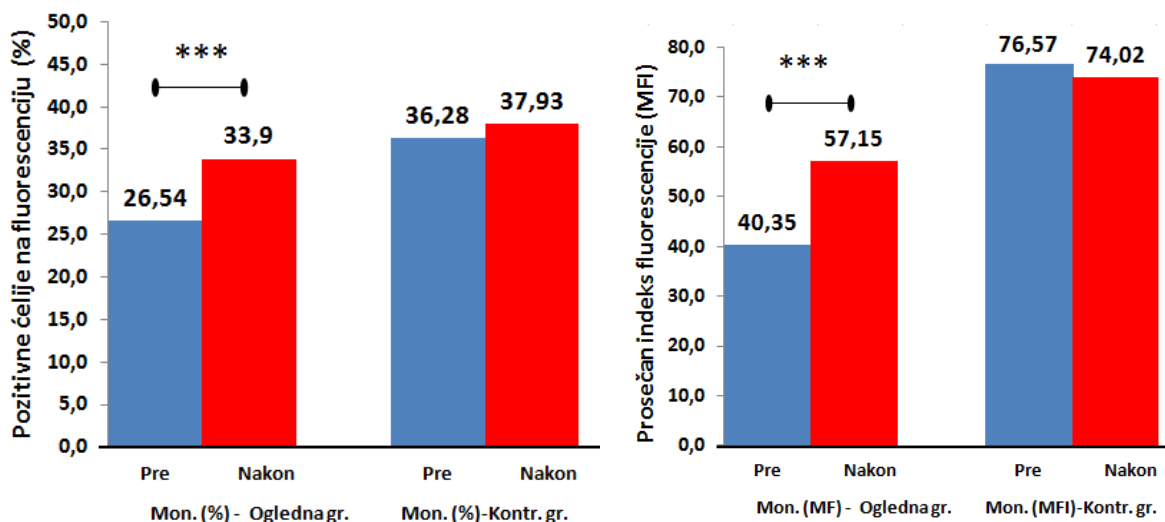
Grafikon 6.2.8. Srednje vrednosti intenziteta fagocitoze PMNL (MFI) krvi nakon fagocitoze kod krava pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, pre i na kraju oglada u kontrolnoj grupi

Tretman vitaminom C je imao pozitivan i snažan uticaj na fagocitozu PMNL krvi. Procenat aktiviranih ćelija u procesu fagocitoze kao i intenzitet fagocitoze (MFI) nakon tretmana vitaminom C je bio visoko statistički značajno veći ($p < 0,001$). Procenat aktiviranih ćelija u pravcu fagocitoze je vrlo visok i kod ogledne i kontrolne grupe, uz mali koeficijent varijacije analiziranog parametra (8,95% i 7,26%). Intenzitet fagocitoze (broj fagocitovanih bakterija) se ispoljava intenzitetom fluorescence (MFI) PMNL krvi. Može se uočiti značajan rast prosečnog indeksa fluorescence (MFI) sa $471,73 \pm 123,41$ na $615,65 \pm 218,24$. Vrednosti u kontrolnoj grupi, nasuprot ovome, beleže smanjenje.

6.3.2. Fagocitna sposobnost monocita iz krvi krava nakon terapije vitaminom C

Srednje vrednosti i statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima za procenat monocita krvi koji su izvršili fagocitozu (jedne ili više bakterija) prikazane su na grafikonu 6.2.9. Prosečan intenzitet fluorescencije (MFI) je prikazan na grafikonu 6.2.10., u zavisnosti od aplikacije vitamina C, pre i na kraju ogleda.

U tabelama 5.2.17. i 5.2.18. su iznete vrednosti deskriptivnih statističkih parametara za procenat monocita krvi koji su izvršili fagocitozu (jedne ili više bakterija), kao i vrednosti intenziteta njihove fluorescence (MFI), u oglednoj i kontrolnoj grupi krava.



Grafikon 6.2.9. Srednje vrednosti fagocitne sposobnosti monocita krvi koji su izvršili fagocitozu (jedne ili više bakterija) kod krava pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, na početku i na kraju ogleda u kontrolnoj grupi

Grafikon 6.2.10. Srednje vrednosti intenziteta fagocitoze monocita (MFI) krvi nakon fagocitoze kod krava pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, pre i na kraju ogleda u kontrolnoj grupi

Slično PMNL iz krvi, srednje vrednosti procenta aktivnih monocita iz krvi u procesu fagocitoze kao i intenzitet njihove fagocitoze, nakon tretmana vitaminom C, ispoljavaju

statistički visoko značajan stepen aktivacije ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolnu grupu gde su razlike bile samo numeričke ($p > 0,05$).

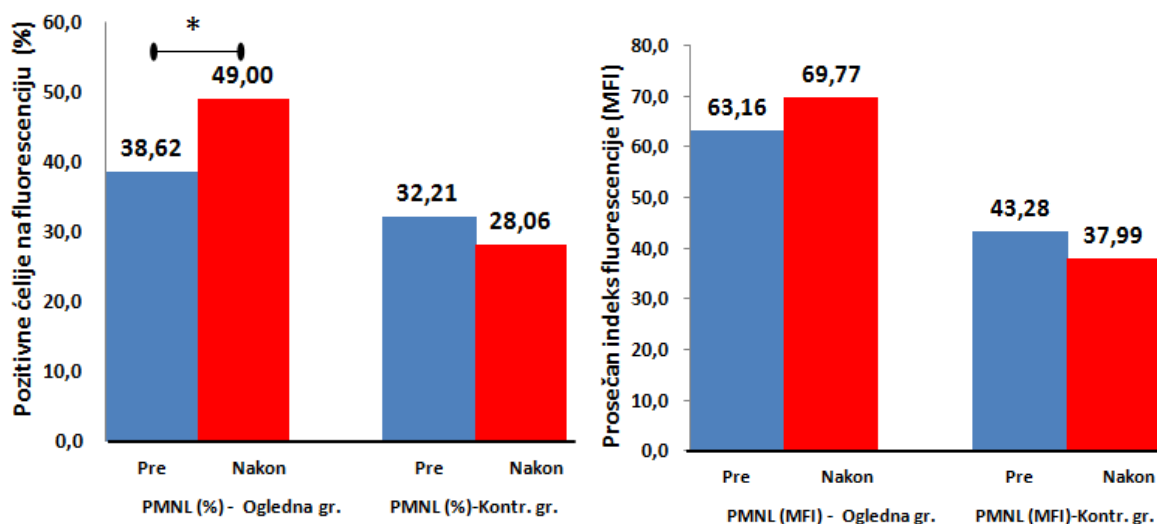
PMNL i monociti krvi su imali visoke procenete fagocitoze (oko 90 %). Ovi rezultati odgovaraju nalazima Materus i sar. (2002) i Milovanovića (2014), gde su korišćene iste metode analize (protočna citometrija) i komponente za analizu (komercijalni "Fagotest" kit istog proizvođača). Zerbe i sar. (1996) nalaze vrednosti od 73,8-78,8 % PMNL sa izvršenom fagocitozom, dok su ove vrednosti prema Moye i sar. (2008) kod krava sa jednokratnom mužom kreću do 34,1 %, a sa dvokratnom mužom do 54,4%. Varijacije postoje u zavisnosti od perioda analiza (kasni graviditet ili 1-7., 14-21., i 42-49. dan laktacije).

Kent i Newbould (1969) su mikroskopskim pregledom ustanovili da 44 % PMNL krvi može da fagocituje *Staphylooccus aureus*, sa 1,70 fagocitovanih bakterija, dok je ovaj procenat za PMNL mleka svega 30% sa 1,07 fagocitovanih bakterija. Ukoliko se izvrši opsonizacija *Staphylooccus aureus-a*, aktivacija fagocitoze je znatno olakšana i raste na 80% (Paape i sar., 1975). U našem testu, materijal za fagocitozu predstavljaju opsonizovane, FITC-om obeležene bakterije *E. coli*, usled čega je fagocitoza dominantno visokog procenta i intenziteta iz pune krvi.

6.3.3. Respiratorni prasak PMNL iz krvi krava nakon terapije vitaminom C

Oksidativni (respiratorni) prasak podrazumeva oslobađanje reaktivnih radikala kiseonika. Ova funkcionalna reakcija je odbrambeni mehanizam domaćina, ali takođe, može dovesti do kolateralnih oštećenja tkiva domaćina (Chen i Junger, 2012). Nakon stimulacije, granulociti i monociti proizvode reaktivne metabolite (superoksidne anjone, hidrogen peroksid i hipohlornu kiselinu) kojima uništavaju bakterije unutar fagozoma. Formiranje reaktivnih peroksida u ovim ispitivanjima je praćeno dodavanjem i oksidacijom dihidrorodamina (DHR) 123, kao bojenog reagensa-indikatora reakcije.

Srednje vrednosti i statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima procenta PMNL krvi koji su izvršili respiratorni prasak, kao i prosečnom intenzitet njihove fluorescence (MFI-indikator snage ROS reakcije), pre i nakon tretmana vitaminom C, odnosno, na početku i na kraju oglada kontrolne grupe prikazane su u grafikonima 6.2.11. i 6.2.12.



Grafikon 6.2.11. Srednje vrednosti respiratornog praska PMNL krvi koji su izvršili fagocitozu (jedne ili više bakterija) kod krava pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, pre i na kraju oglada u kontrolnoj grupi

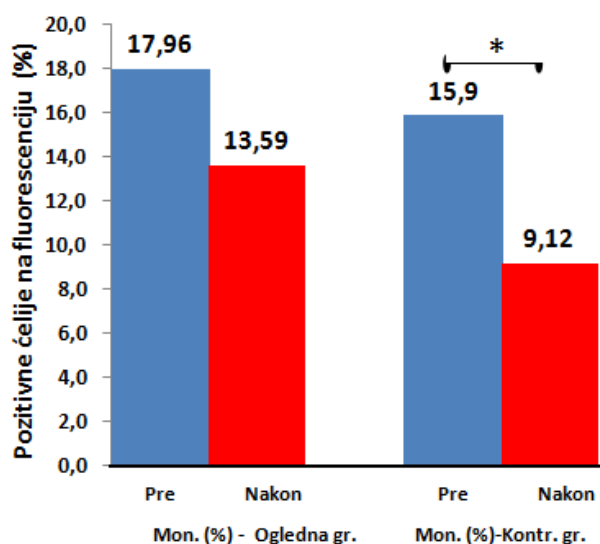
Grafikon 6.2.12. Srednje vrednosti intenziteta respiratornog praska PMNL (MFI) krvi nakon respiratornog praska kod krava pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, pre i na kraju oglada u kontrolnoj grupi

Procenat PMNL krvi koji su izvršili respiratorni prasak je bio statistički značajno viši ($p < 0,05$) u grupi krava tretiranoj vitaminom C. Ovaj porast se kretao od $38,62 \pm 16,58\%$ pre tretmana do $49,00 \pm 18,83\%$ nakon tretmana. Indeks respiratornog praska (MFI, kao indikator snage ROS reakcije) je bio viši kod tretiranih krava, ali je ova razlika bila samo numerička. U kontrolnoj grupi nije ustanovljena statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima na početku i na kraju oglada ($p > 0,05$), a čak je zabeležen umeren pad procenta ROS aktiviranih PMNL. Kako je ranije navedeno, vrednosti za respiratorni prasak su po pravilu niže u odnosu na fagocitozu (Mehrzhad i sar., 2009). Ovo se pogotovo odnosi na monocite (Moya i sar., 2008).

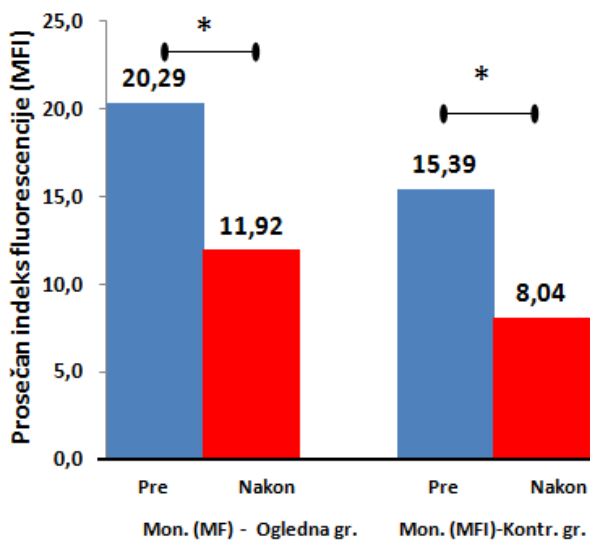
U ispitivanju Zerbe-a i sar. (1996) kao i Milovanovića (2014) intenzitet respiratornog praska je ispoljavao značajne promene kako po danima laktacije, tako i prema budućem reproduktivnom statusu i on može biti pouzdan indikator u oceni imunskog statusa. Uočene su statistički značajne i vrlo značajne razlike u srednjim vrednostima ROS reakcije prvih 15 dana laktacije u odnosu na period pre teljenja i nakon 16. dana laktacije, kao i između steone i problematične grupe krava odmah po teljenju (1-15. dan laktacije, $p < 0,05$; Milovanović, 2014).

6.3.4. Respiratorni prasak monocita iz krvi krava nakon terapije vitaminom C

Na grafikonu 6.2.13. su prikazane srednje vrednosti i statistička značajnost razlika u njima za procenat monocita iz krvi koji su aktivirani za produkciju ROS (nakon fagocitoze jedne ili više bakterija), a prosečan intenzitet fluorescencije (MFI) je prikazan na grafikonu 6.2.14., u zavisnosti od aplikacije vitamina C, pre i na kraju oglada.



Grafikon 6.2.13. Srednje vrednosti respiratornog praska monocita krvi koji su izvršili fagocitozu (jedne ili više bakterija) kod krava pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, pre i na kraju oglada u kontrolnoj grupi



Grafikon 6.2.14. Srednje vrednosti intenziteta respiratornog praska monocita (MFI) krvi nakon respiratornog praska pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, pre i na kraju oglada u kontrolnoj grupi

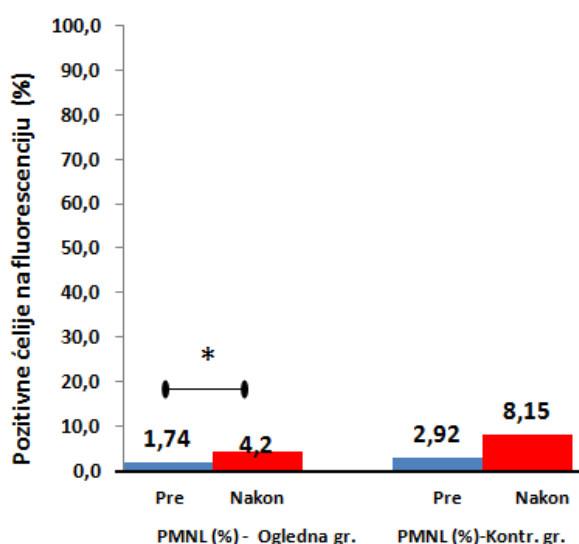
Slično negativnom trendu u procentu ROS aktiviranih monocita krvi, na grafikonu 6.2.14. se može uočiti statistički značajan pad prosečnog intenziteta fluorescence (MFI) monocita krvi kod ogledne i kontrolne grupe ($p < 0,05$). Dobijene vrednosti za reakcije respiratornog praska monocita krvi su višestruko niže u odnosu na vrednosti respiratornog praska PMNL krvi. Visoke doze vitamina C su imale deprimirajući efekat na parametre respiratornog praska monocita krvi ali bez dokazane statističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima.

6.4. Funkcionalna aktivnost polimorfonuklearnih leukocita i monocita iz mleka krava nakon terapije vitaminom C

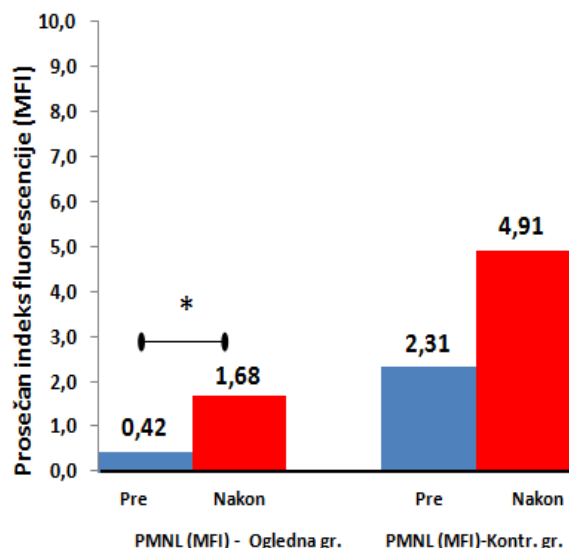
U ovom delu ispitivanja je izvršena procena lokalne reaktivnosti imunskog sistema preko nespecifične odbrambene funkcije PMNL i monocita iz mleka krava, pre i nakon terapije vitaminom C, odnosno, na početku i na kraju ogleda bez terapije (kontrolna grupa).

6.4.1. Fagocitna sposobnost PMNL iz mleka krava nakon terapije vitaminom C

Na grafikonima 6.2.15. i 6.2.16. su prikazane srednje vrednosti i statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima procenta PMNL iz mleka krava koji su izvršili fagocitozu, kao i prosečan intenzitet njihove fluorescence (MFI) na početku i na kraju ogleda.



Grafikon 6.2.15. Srednje vrednosti fagocitne sposobnosti PMNL mleka koji su izvršili fagocitozu (jedne ili više bakterija) kod krava pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, na početku i na kraju ogleda u kontrolnoj grupi



Grafikon 6.2.16. Srednje vrednosti intenziteta fagocitoze PMNL (MFI) mleka nakon fagocitoze kod krava pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, pre i na kraju ogleda u kontrolnoj grupi

Pozitivni efekti C vitamina na fagocitozu i intenzitet respiratornog praska zabeleženi su kod PMNL mleka, ali je detektovana fagocitna sposobnost bila niskog intenziteta nakon migracije iz krvotoka u lumen mlečne žlezde (<5 % aktivnih ćelija; $p < 0,05$). Kod 30% uzoraka je izostala fagocitna aktivnost na testu izvedenom protočnom citometrijom. Jedan od mogućih razloga je taj što somatske ćelije mleka čini heterogena populacija: neutrofilni granulociti, limfociti, eozinofilni granulociti, makrofazi i epitelne ćelije (Pillai i sar., 2001), a

nemaju sve sposobnost fagocitoze. Drugi mogući razlog može biti u činjenici da su ove ćelije kratkoživeće (1-2 dana u tkivima).

Dokazano je da je fagocitna sposobnost PMNL je u mlečnoj žlezdi smanjena (Paape i sar., 1979). Broj bakterija koji je bio uništen od strane PMNL mleka je bio daleko manji nego što je to slučaj sa PMNL krvi.

Manja vijabilnost PMNL u mleku u odnosu na PMNL krvi zavisi i od stadijuma laktacije i starosti samih neutrofilnih granulocita (Mehrzaad i sar., 2002). Fagocitoza *S. aureus* od strane PMNL u mleku primiparih krava je iznosila $20,7 \pm 2$ %, dok je kod multiparih krava ova vrednost bila $10,2 \pm 1,3$ % ($p < 0,001$). U našem slučaju se radilo o supkliničkim infekcijama koje su verovatno bile subakutnog toka.

Slabiji intenzitet fagocitoze PMNL iz ispiraka materice, ali samo u ranom periodu laktacije, opisan je u radu Milovanovića (2014). Prvi lavaž uterusa je u ovim ispitivanjima uziman u periodu od 30-60. dana nakon teljenja, a zatim nakon 60. dana. U ranoj fazi (30-60. dan) fagocitoza bila je zastupljena sa svega 6,79 %, a u kasnijem periodu, sa oporavkom materice, vrednost ovog parametra je iznosila 50,87 % (nakon 60 dana). Inače se procenat živih ćelija dobijenih ispiranjem materice Folijevim kateterom kretao od 50 do 70 %, pri čemu je $59,03 \pm 15,03$ % pripadalo populaciji PMNL. Verovatno bi se slične vrednosti mogle očekivati i kod PMNL mleka.

Mleko ne sadrži dovoljno materija koje su donekle esencijalne za pun kapacitet funkcije neutrofilnih granulocita. Utvrđeno je da je nedostatak glukoze bio limitirajući faktor za fagocitozu bakterija *S. aureus* u mleku (Newbould, 1973). PMNL mleka sadrže 38% manje deponovanog glikogena nego PMNL krvi i stoga se ovaj nedostatak energije smatra jednim od faktora njihove smanjene fagocitne funkcije (Paape i sar., 1979). Dodatni limitirajući razlog smanjenog intenziteta fagocitoze, od strane PMNL mleka, su kapljice masti i kazein, kao i smanjeno prisustvo opsonina (Paape i Guidry, 1977; Guidry i sar., 1980).

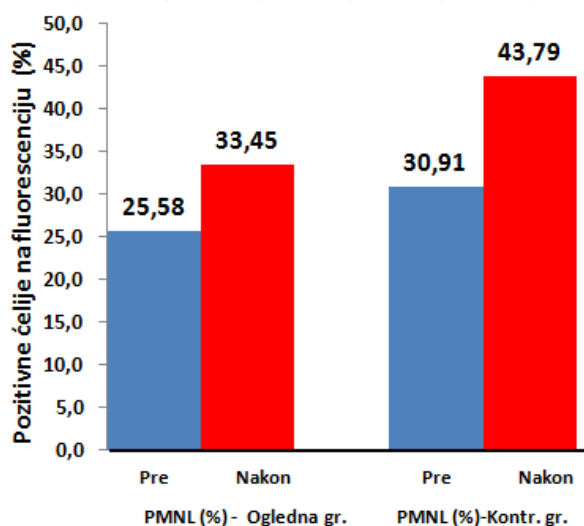
6.4.2. Fagocitna sposobnost monocita iz mleka krava nakon terapije vitaminom C

Fagocitna sposobnost monocita mleka je bila izrazito slaba, odnosno, izostala je kod 90% (27/30) uzoraka mleka krava ogledne grupe. Fiziološki slabiji intenzitet fagocitoze koji je karakterističan za monocite, dodatno je otežan migracijom ovih ćelija u mlečnu žlezdu i mlekom kao medijumom, tako da je njegovo učešće u procesu direktne fagocitoze bakterija zanemarljivo. Slični rezultati su registrovani i u kontrolnoj grupi plotkinja tako da nisu razmatrani i daljem tekstu.

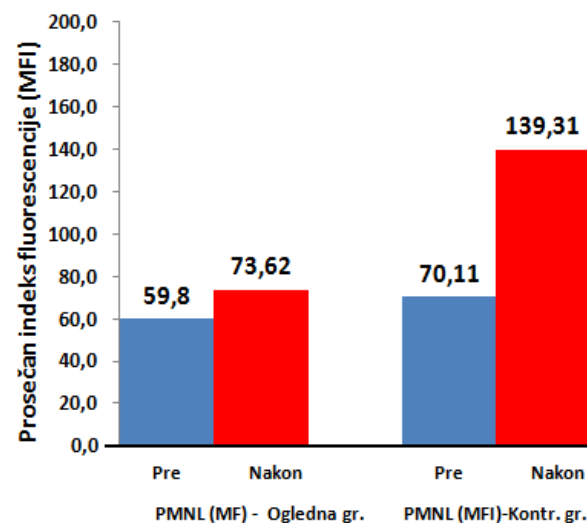
6.4.3. Respiratorni prasak PMNL iz mleka krava nakon terapije vitaminom C

Za razliku od fagocitoze, proces stvaranja reaktivnih oksida u PMNL mleka nije bio ometen. Proces stvaranja reaktivnih oksida u PMNL i monocitima mleka i intenzitet respiratornog praska je bio sličan kao u krvi (visok), ali bez statističkih značajnosti u srednjim vrednostima između grupa na početku i kraju oglada.

Prikaz srednjih vrednosti za PMNL mleka koji su izvršili respiratorni prasak, kao i prosečan intenzitet njihove fluorescence (MFI, kao indikator snage ROS reakcije), pre i nakon tretmana vitaminom C, odnosno, pre i nakon oglada u kontrolnoj grupi, dat je na grafikonima 6.2.17. i 6.2.18.



Grafikon 6.2.17. Srednje vrednosti respiratornog praska PMNL mleka koji su izvršili fagocitozu (jedne ili više bakterija) kod krava pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, pre i na kraju oglada u kontrolnoj grupi



Grafikon 6.2.18. Srednje vrednosti intenziteta respiratornog praska PMNL (MFI) mleka nakon respiratornog praska kod krava pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, pre i na kraju oglada u kontrolnoj grupi

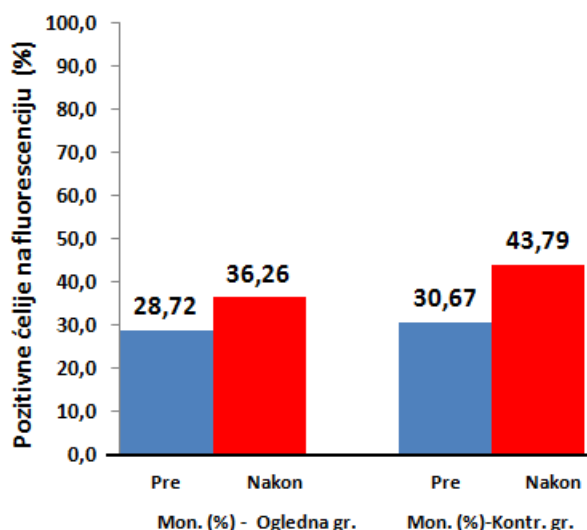
Proces stvaranja reaktivnih oksida u PMNL mleka i intenzitet respiratornog praska sličan je kao u krvi (visok), ali bez statističkih značajnosti između grupa na početku i kraju oglada. Kod obe grupe zapaža se povećanje procenta ćelija koje su pozitivno reagovala, ali su ove vrednosti bez statističke značajnosti usled visokih varijacija.

Slično procentu PMNL mleka koji su reagovali respiratornim praskom, nisu utvrđene statističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima u intenzitetu respiratornog praska (MFI) između ogledne i kontrolne grupe ($p > 0,05$). U ovom slučaju se takođe beleži porast vrednosti

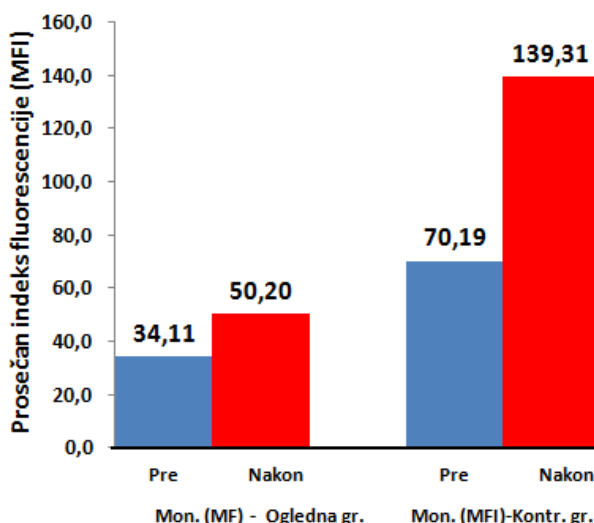
u ogednoj i kontrolnoj grupi na kraju tretmana (ogleda), a vrednosti su ispoljavale visok stepen oscilacija.

6.4.4. Respiratorni prasak monocita iz mleka krava nakon terapije vitaminom C

Srednje vrednosti procenta monocita mleka koji su izvršili respiratorni prasak, kao i prosečan intenzitet njihove fluorescence (MFI-indikator snage ROS reakcije), pre i nakon tretmana vitaminom C, odnosno, na početku i na kraju ogleda u kontrolnoj grupi prikazane su na grafikonima 6.2.19. i 6.2.20.



Grafikon 6.2.19. Srednje vrednosti respiratornog praska monocita mleka kod krava pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, pre i na kraju ogleda u kontrolnoj grupi



Grafikon 6.2.20. Srednje vrednosti intenziteta respiratornog praska monocita (MFI) mleka kod krava pre i na kraju tretmana vitaminom C, odnosno, pre i na kraju ogleda u kontrolnoj grupi

Registrovane vrednosti imaju tendencu rasta na kraju ogleda, odnosno, na kraju tretmana vitaminom C. Razlike u srednjim vrednostima su bile samo numeričke, i nije dokazana statistička značajnost razlika između njih ($p > 0,05$).

Za razliku od PMNL mleka, monociti ispoljavaju dvostruko manju aktivnost ćelija u ROS reakciji. Tako je u kontrolnoj grupi krava bilo 73,62% ROS aktiviranih PMNL, dok je ova vrednost kod monocita bila 36,26% na kraju tretmana vitaminom C.

Dosogne i sar. (1999) navode da je kod krava oksidativni prasak neutrofilnih granulocita, u periodu od prve do treće nedelje nakon telenja, znatno smanjen.

Uzevši sve sprovedene analize, sopstvene rezultate, kao i nalaze i zaključke drugih autora može se izneti sledeće:

Biološka uloga askorbinske kiseline je višestruka: ona učestvuje u oksido-redukcionim procesima, koagulaciji krvi, regeneraciji tkiva, sintezi steroidnih hormona i aktivaciji mnogih enzima. Vitamin C deluje na funkcije centralnog nervnog sistema, stimuliše funkciju endokrinih žlezda i stimuliše funkcije jetre. On takođe poboljšava pokretljivost neutrofilnih granulocita i njihov fagocitni potencijal (Anderson 1984, Roth i Kaeberle, 1985) i veoma je koristan u prevenciji i terapiji brojnih obolenja (Ladmakhi i sar., 1997). Askorbinska kiselina ima kao antioksidans veliki značaj u terapiji mastitisa indukovanih endotoksinom (Chaiyotwittayakun i sar., 2002). Pad koncentracije vitamina C je izražen tokom supkliničkog, a pogotovo tokom kliničkog mastitisa (von Wendt, 1938; Reineke i sar., 1940; Kleczkowski i sar., 2005).

U ovom radu je glavna pažnja bila usmerena na povećanje efikasnosti imunskog sistema intenziviranjem procesa fagocitoze i respiratornog prasaka PMNL i monocita mleka i krvi. Vitamin C povećava fagocitnu aktivnost leukocita i ona raste linearno sa povećanjem koncentracije ovog vitamina. Shodno tome, osnova ovog istraživanja je bila utemeljena na pretpostavci da se poboljšanje opšte otpornosti organizma stimulacijom funkcija neutrofilnih granulocita (fagocitoza i respiratorni prasak) kao prve linije odbrane od infekcija može postići produženom aplikacijom visokih doza vitamina C, višestruko većim od farmakološki preporučenih (čak i do 10 puta). Za uslovno grlo od 500 kg preporuke vitamina C kreću se do oko 1 500 mg dnevno. U našem slučaju korišćene su doze od 12 500 mg dnevno (25mg/kg TM/dan; SC). Takođe su očekivani pozitivni efekti u smislu smanjenja broja somatskih ćelija u mleku i poboljšanja ukupnog zdravstvenog i reproduktivnog statusa.

Dodavanje vitamina C *per os*, prema Weiss i Hogan-u (2007) nije uticalo na stepen fagocitoze od strane PMNL ili na uništavanje bakterija. Ovakav nalaz je verovatno posledica razlaganja vitamina od strane mikroflora buraga. Nasuprot ovome, prema Ranjan i sar. (2005), intramuskularno ubrizgavanje L-askorbinske kiseline u dozi od 20 mg/kg TM tokom

3 uzastopna dana, uz antibiotsku terapiju, poboljšalo je efekte antibiotske terapije kliničkog mastitisa krava.

Roth i Kaeberle (1985) iznose zanimljive zaključke u vezi uticaja askorbinske kiseline u goveda gde su doze od 20 mg/kg TM aplikovane SC povećale oksidativni metabolizam PMNL i njihovu sposobnost da posreduju u ćelijskoj citotoksičnosti zavisnoj od antitela. Primjenjene doze su bile približne onima koje su korišćene u našem ogledu, a i način aplikacije je bio isti. Ovi autori su dokazali pojačanu fagocitozu *Staphylococcus aureus-a* od strane PMNL tretiranih krava. Neutrofilni granulociti koji su bili oslabljeni tretmanom deksametazonom ponovo uspostavljaju normalnu fagocitnu sposobnost dodavanjem askorbinske kiseline. Slične zaključke iznose i sledeći autori: Thomas i Holt, 1978; Levin, 1975; Cummins i sar., 1992; Hidiroglou i sar., 1995; Kobiesi i El-Ali, 1994. Takođe, Calsamiglia i Rodriguez (2012) smatraju da je vitamin C od koristi u terapiji mastitisa zbog stimulacije funkcija neutrofilnih granulocita.

Broj dostupnih radova koji ukazuju na štetnost upotrebu prekomernih doza vitamina C je izuzetno mali. Poznato je da se višak C vitamina eliminiše iz organizma preko bubrega (Clark, 2007). Niske doze vitamina C ne utiču na njegov klirens, sve do primene doze od 20 mg/kg TM dnevno. Doze koje su korišćene u našem ogledu su bile nešto više (25 mg/kg TM), i to su doze koje treba da dovedu do zasićenja organizma (Padilla i sar., 2007). Ove koncentracije su koristili i Chaiyotwittayakun i sar. (2002). Oni su utvrdili da je tretman askorbinskom kiselinom intravenoznom injekcijom, dva puta u roku od 5 časova, u količini od 25 g uticao na smanjenje jačine akutne upale vimena, prethodno indukovanoj intramamarnom infuzijom endotoksina. Slične doze sinergistički deluju sa antibiotskim tretmanom (Naresh i sar., 2002) na oporavak od kliničkog mastitisa, kao i na smanjenje broja somatskih ćelija u mleku (Weiss i Hogan, 2007).

Distribucija C vitamina nije istovetna u celom organizmu i neka tkiva održavaju koncentraciju askorbinske kiseline na znatnom višem nivou u odnosu na nivo u krvi. Neki organi, kao što su endokrini deo hipofize ili timus, mogu da akumuliraju i do sto puta više askorbinske kiseline u odnosu na krvnu plazmu. Organi sa 10 do 50 puta većom koncentracijom vitamina C su pluća, testisi, mozak, jetra, štitna žlezda, bubrezi, pankreas i pljuvačne žlezde (Douglas i sar., 2004; Bjelaković i sar., 2008).

Još uvek se raspravlja o tome koje su stvarne potrebe PMNL u vitaminu C. U radu Bozonet i sar. (2015) se govori o mogućoj stimulaciji funkcije PMNL fiziološkim dozama vitamina C iz kiviya i ukazuje se na različite potrebe PMNL za vitaminom C u zavisnosti od njegove aktivnosti (hemotakse, proizvodnje ROS, NET-a ili apoptoze). Hemotaksa se javlja u ranoj fazi fagocitoze, pre oksidativnog praska, i verovatno zavisi od postojećih intracelularnih rezervi vitamina C. Za proizvodnju superoksida, tokom ROS reakcije, potreban je unos veće količine dehidroaskorbinske kiseline (DHA) u unutrašnjost PMNL (Washko i sar., 1993), i te su potrebe veće.

Međutim postoje dokazi da uticaj askorbinske kiseline na stimulaciju i inhibiciju ROS reakcije zavisi od njegove koncentracije i da u zavisnosti od koncentracije askorbinske kiseline, efekti nisu samo jednostrani, već i dvojaki. U nižim, mikromolarnim koncentracijama, postoji katalitičko-stimulatorni efekt C vitamina na aktivnost mijeloperoksidaze (MPO), dok u visokim koncentracijama on "čisti" slobodne radikale kiseonika (ROS *scavenger*; Carr, 2002). Vitamin C pojačava fagocitnu i baktericidnu efikasnost PMNL ovaca i hipotetski, višak vitamina C u ćelijama može smanjiti aktivnost NADPH oksidaze redukujući superoksid u hidrogen peroksid (Altinsaat i sar., 2008). Ovo saznanje se može eventualno primeniti u objašnjenju izostanka očekivano intenzivnijih reakcija respiratornog praska PMNL i monocita na aplikaciju visokih doza vitamina C i njegovog skladištenja u ovim ćelijama koje su inače veliki depoi askorbata.

Neophodnost C vitamina za funkcije neutrofilnih granulocita se ogleda i u njegovoj akumulaciji. Dokazano je da je koncentracija vitamina C 40-60 puta veća u ovim ćelijama nego u krvnoj plazmi. Od koncentracije vitamina C direktno zavise pokretljivost i fagocitni kapacitet PMNL (Roth i Kaeberle, 1985).

Baspinar i sar. (1998) su ispitivali efekat dodavanja vitamina C na funkcije PMNL (fagocitne i mikrobicidne aktivnosti) i na unutarćelijski nivo vitamina C. U ovom ispitivanju su analizirani PMNL jedanaest zdravih holštajn junica. Fagocitna i mikrobicidna aktivnost neutrofilnih granulocita je određivana fluorescentnom mikroskopskom tehnikom a sadržaj vitamina C u ćeliji je meren spektrofotometrijski. Dodavanjem 50, 150 i 300 $\mu\text{mol/L}$ vitamina C u medijum za inkubaciju tokom 135 min. na 37 °C, intenzitet fagocitoze je bio povećan za 149,76 %; 289,78 % i 462,76 % u odnosu na kontrolne uzorke. Ovi rezultati

ukazuju da se stepen fagocitoze i mikrobicidna aktivnost PMNL povećavaju u zavisnosti od koncentracije vitamina C.

Prema Evansu i sar. (1982), sadržaj askorbinske kiseline po ćeliji je bio viši kod mononuklearnih leukocita i granulocita nego kod trombocita i eritrocita. Intracelularna koncentracija u ovim ćelijskim elementima krvi je veoma visoka. Kada se uporede sa koncentracijom u plazmi, dobijaju se sledeće vrednosti: mononuklearni leukociti 80, trombociti 40 i granulociti 25 puta više.

Weiss i Hogan (2007) navode da su koncentracije vitamina C u PMNL izolovanih iz mleka oko tri puta veće od koncentracija ovog vitamina u PMNL krvi.

Razlozi slabije funkcije PMNL i monocita u mleku u pogledu fagocitoze u ogledu mogu se objasniti na više načina iz dostupne literature i rezultata drugih autora. Poznato je da je životni ciklus PMNL kod goveda relativno kratak, pogotovo u mleku, gde obavljaju ulogu fagocitoze tokom 1 do 2 dana (Carlson i Kaneko, 1975). Zbog toga je moguće očekivati veći broj PMNL u apoptotičnoj ili nekrotičnoj formi nakon izvršene fagocitoze. Prema van Oostveldtu i sar. (2001), apoptoza i nekroza PMNL iz krvi i mleka je češća kod krava na početku nego na kraju laktacije i kreće se oko 25,9 % ($p < 0,05$) u odnosu na procenat nekrotičnih PMNL iz sredine perioda laktacije (14,2%). Energetska rezerva u PMNL posle dijapedeze do vimena ili materice je smanjena jer se tokom nje gubi oko 38 % glikogena (Carlson i Kaneko, 1975). Takođe se sadržaj mijeloperoksidaze, enzima koji je neophodan za formiranje peroksidnih radikala, nakon dijapedeze smanjuje za $30 \pm 3,9$ % u *in vivo* uslovima (Gruner i sar., 1982). Glukoza je bitan činilac za intenzitet respiratornog praska (Naidu i Newbould, 1973) i dokazano je da u *in vitro* uslovima dodavanje glukoze intenzivira proces fagocitoze (Newbould, 1970).

Intenzitet fagocitoze od strane PMNL nakon prolaska i migracije kroz tkiva i bazalne membrane smanjivala se i u našem ogledu, kao što je to bio slučaj pri migraciji u lumen materice. Zerbe (1996) navodi da PMNL iz materice imaju znatno umanjenu fagocitnu sposobnost u poređenju sa PMNL iz krvi, što je takođe bio nalaz i u našem ogledu.

Može da se pretpostavi da se korišćenim testovima fagocitoze i respiratornog praska detektuju PMNL i monociti u trenutku aktiviranja vanćelijske neutrofilne mreže (engl.

neutrophil extracellular traps - NETs). Usled dugotrajne izloženosti neutrofilnih granulocita bakterijama dolazi do aktiviranja mehanizma fagocitoze i usled brzog zasićenja oni uginjavaju i aktivira se programirana ćelijska smrt sa oslobađanjem NETs iz aktiviranih neutrofilnih granulocitanih granulocita. Da bi nastupila smrt ćelije ovim putem neophodna je ROS aktivacija ćelija i formiranje NETs nije moguće bez respiratornog praska i aktiviranja enzima peroksidacije. Struktura PMNL više ne postoji tako da nema ni detekcije fagocitovanih mikroorganizama, već se ćelije prepoznaju u njihovom završnom koraku programske ćelijske smrti i NET "hvatanja", uz oslobađanje ROS (Fuchs i sar., 2007).

Više vrednosti broja somatskih ćelija (BSC) u mleku su, po pravilu, u negativnoj korelaciji sa sposobnošću fagocitoze. Krave koje imaju BSC ispod 200 000/mL imaju i manji rizik za pojavu mastitisa nego krave sa višim BSC (van Oostveldt i sar., 2001).

Za razliku od oslabljene fagocitoze PMNL i monocita iz mleka, njihova ROS reakcija kako po procentualnom udelu ROS pozitivnih ćelija, tako i po intenzitetu reakcije, se nisu značajnije razlikovale u poređenju sa vrednostima iz krvi. Prema tome sama migracija im nije štetila. Slične rezultate nalazimo u radu Zerbe-a i sar. (1996) kao i Milovanovića (2014) a odnose se na respiratorni prasak PMNL i monocita iz materice. Može se zaključiti da se respiratornim praskom kompenzuje znatno slabija fagocitna sposobnost PMNL i monocita materice. Oba autora zapažaju da je fagocitna sposobnost PMNL iz materice krava znatno smanjena dok se ROS reakcija za PMNL materice nije razlikovala od one kod PMNL krvi. Ovi rezultati u potpunosti se podudaraju sa rezultatima dobijenim u okviru ove doktorske disertacije.

Našim rezultatima je ubedljivo dokazan pozitivan efekat visokih doza vitamina C na kliničke efekte smanjenja pozitivne reakcije mleka u CM testu. Efektorni mehanizam se verovatno zasniva na pojačanju, pre svega, fagocitne sposobnosti PMNL i monocita krvi. Potvrđeno je da je fagocitna sposobnost PMNL i monocita i intenzitet fagocitoze smanjen nakon njihove migracije iz krvotoka u lumen mlečne žlezde, ali se ovaj efekat kompenzuje pojačanim respiratornim praskom u mleku. Snažna ROS reakcija uz slabu fagocitozu verovatno je dokaz NET ćelijske smrti PMNL.

Postoji mogućnost da visoke doze vitamina C ipak imaju supresivni efekat na respiratorni prasak pogotovo kod monocita, jer su ove fagocitne ćelije poznate po visokoj

sposobnosti akumulacije C vitamina, a to može imati za posledicu inhibitorni efekat. Potrebno je dodatnim ispitivanjima razmotriti modifikaciju (smanjenje) doze vitamina C kako bi se efekti ove alternativne terapije dodatno poboljšali, odnosno, optimizovali.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata, dobijenih istraživanjima u okviru ove doktorske disertacije, mogu se formulirati sledeći zaključci:

1. Posle 5-dnevne aplikacije visokih doza vitamina C došlo je do izostanka CMT (*California Mastitis Test*) pozitivne reakcije u mleku poreklom iz 66,67% četvrti tretiranih krava u fazi rane laktacije.
2. U mleku krava sa supkliničkim mastitisom, tretiranih visokim dozama vitamina C, došlo je do smanjenja broja bakterijskih kolonija za 40,35 %, dok je u oglednoj grupi ovo smanjenje iznosilo 31,70 %. Ukupan broj bakterijskih izolata je takođe bio smanjen u tretiranoj grupi krava za razliku od kontrolne grupe (75 : 66 i 33 : 34). U obe grupe krava, dominantni izolati su bili *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* i *Prototheca* kao i apatogeni sojevi iz roda *Micrococcus* i *Bacillus*.
3. Broj somatskih ćelija u mleku je nakon tretmana vitaminom C, bio značajno smanjen ($p < 0,05$). Izlečenje je utvrđeno u 66,67% slučajeva (24/36 četvrti). U kontrolnoj grupi je od 12 četvrti, spontano došlo do smanjenja broja ćelija samo u jednom slučaju (8,33%).
4. Tretman visokim dozama vitamina C, nije uticao na broj eritrocita, koncentraciju hemoglobina, hematokritsku vrednost i izvedene parametre crvene krvne slike.
5. Ukupan broj leukocita, broj polimorfonuklearnih leukocita i limfocita, kao i njihov odnos, nije se menjao u zavisnosti od tretmana vitaminom C. Kod grla u ranoj laktaciji, sa pozitivnom CMT reakcijom u mleku, broj polimorfonuklearnih leukocita je bio povećan.
6. Kod krava tretiranih supkutano C vitaminom registrovano je statistički visoko značajno povećanje procenta aktiviranih polimorfonuklearnih leukocita i monocita krvi ($p < 0,001$) uključenih u proces fagocitoze kao i veći intenzitet fagocitoze (MFI), što govori o snažnom stimulativnom dejstvu vitamina C na odbrambeni sistem. Stimulativni efekti su zabeleženi i kod polimorfonuklearnih leukocita mleka ali je fagocitoza bila niskog intenziteta (< 5 % aktivnih ćelija; $p < 0,05$).

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

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

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

10. Terapija supkliničkih mastitisa visokim dozama vitamina C može biti prihvatljiva alternativa ili potpora antibiotskoj terapiji.

8. LITERATURA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 8th ed. Saunders: Elsevier Inc; 2015.
2. Abubakar M, Muhammad G, Ibrahim K. Primary and secondary immune response to formalin inactivated *Streptococcus agalactiae* isolates in rabbits. Pak Vet J. 2006;26(3):115-7.
3. Ackerman SJ, Gleich GJ, Loegering DA, Richardson BA, Butterworth AE. Comparative toxicity of purified human eosinophil granule cationic proteins for schistosomula of *Schistosoma mansoni*. Am J Trop Med Hyg. 1985;34(4):735-45.
4. Adamović M, Galović B, Stojanović L, Puđa P, Novaković Ž. Savremena tehnološka i tehnička rešenja muže u funkciji povećanja proizvodnje mleka i očuvanja zdravlja vimena. Vet glasnik. 1996;50(5-6): 299-307.
5. Agosti JM, Altman LC, Ayars GH, Loegering DA, Gleich GJ, Klebanoff SJ. The injurious effect of eosinophil peroxidase, hydrogen peroxide, and halides on pneumocytes *in vitro*. J Allergy Clin Immunol. 1987;79(3):496-504.
6. Ahearn JM, Fearon DT. Structure and function of the complement receptors CR1 (CD35) and CR2 (CD21). Adv Immunol. 1989;46:183-219.
7. Ahluwalia J, Tinker A, Clapp LH, Duchon MR, Abramov AY, Pope S, et al. The large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel is essential for innate immunity. Nature. 2004;427(6977):853-8.
8. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. Nat Neurosci. 2007;10(12):1538-43.
9. Akers RM, Nickerson SC. Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2011;16(4):275-89.
10. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol. 2004;4(7):499-511.
11. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell. 2006;124(4):783-801.
12. Akong-Moore K, Chow OA, von Kockritz-Blickwede M, Nizet V. Influences of chloride and hypochlorite on neutrophil extracellular trap formation. PLoS One. 2012;7(8):e42984.
13. Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. Immunity. 2007;27(2):190-202.
14. Altınsoat Ç, Hatipoğlu FŞ. Effects of vitamin C and ACTH applications on phagocytic activity of neutrophil leukocytes in sheep. 2008. Veteriner Cerrahi Dergisi, 14 (1), 5-8.
15. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. Annu Rev Immunol. 2012;30:459-89.
16. Andersen MH, Schrama D, Straten P, Becker JC. Cytotoxic T cells. J Invest Dermatol. 2006;126(1):32-41.

17. Anderson R, Smit MJ, Joone GK, van Staden AM. Vitamin C and cellular immune functions: protection against hypochlorous acid-mediated inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and ATP generation in human leukocytes as a possible mechanism of ascorbate mediated immunostimulation. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;587:34-48.
18. Anderson KL. Therapy for acute coliforms mastitis. *Comp Cont Educ Pract Vet.* 1989;11:1125-33.
19. Anderson R, Oosthuizen R, Maritz R, Theron A, van Rensburg AJ. The effects of increasing weekly doses of ascorbic acid on certain cellular and humoral immune functions in normal volunteers. *Am J Clin Nutr.* 1980;33(1):71-6.
20. Appelberg R. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends Microbiol.* 2007;15(2):87-92.
21. Arai T, Inoue A, Takeguchi A, Mizutani H, Shimoo M, Sako T, et al. Comparison of enzyme activities in plasma and leukocytes in dairy and beef cattle. *J Ve. Med Sci.* 2003;65(11):1241-3.
22. Arbones ML, Ord DC, Ley K, Ramech H, Maynard-Curry C, Otten G, et al. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity.* 1994;1(4):247-60.
23. Archer RK. *The Eosinophil Leukocytes.* Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1963.
24. Arnljots K, Sorensen O, Lollike K, Borregaard N. Timing, targeting and sorting of azurophil granule proteins in human myeloid cells. *Leukemia.* 1998;12(11):1789-95.
25. Arnold L, Henry A, Poron F, et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med.* 2007;204(5):1057-69.
26. Aroch I, Harmelin A, Sara A, et al. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* mastitis in dairy cows. *Vet Res.* 2003;153(24):746-50.
27. Ataman MB, Erdem H, Bulbul B, Haliloglu S, Cinar M, Akoz M. Plasma beta-carotene, vitamin A and vitamin C levels in cyclic and pregnant cows. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2010;16(4):579-84.
28. Audera C, Patulny V, Sander H, Douglas M. Megadose vitamin C in treatment of the common cold - a randomised controlled trial. *Med J Aust.* 2001;175(7):359-62.
29. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:669-92.
30. Austen KF, Boyce JA. Mast cell lineage development and phenotypic regulation. *Leuk Res.* 2001;25(7):511-8.
31. Avais M, Bilal M, Dhahzad A, Hamees S. Dose dependent antibody response to composite formalin-inactivated *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli* in rabbits. *Int J Agric Biol.* 2007;9(4):622-24.
32. Ayhan A, Altintas A, Tuncer ZS, et al. Prognostic value of mitotic activity, eosinophilic and inflammatory reaction in stage I cancer of the uterine cervix. *Eur J Surg Oncol.* 1992;18(3):264-6.

33. Bainton DF. Morphology of neutrophils, eosinophils, and basophils. In: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, editors. William's hematology. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 2005. p. 831-54.
34. Bainton DF, Farquhar MG. Origin of granules in polymorphonuclear leukocytes. Two types derived from opposite faces of the Golgi complex in developing granulocytes. *J Cell Biol.* 1966;28(2):277-301.
35. Bainton DF, Ullyot JL, Farquhar MG. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med.* 1971;134(4):907-34.
36. Bajer AA, Garcia-Tapia D, Jordan KR, et al. Peripheral blood - derived bovine dendritic cells promote IgG - restricted B cells responses *in vitro*. *J Leukoc Biol.* 2003;73(1):100-6.
37. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998;392(6673):245-52.
38. Banhegyi G, Braun L, Csala M, Puskas F, Mandl J. Ascorbate metabolism and its regulation in animals. *Free Radic Biol Med.* 1997;23(5):793-803.
39. Bannerman DD, Springer HR, Paape MJ, Kauf AC, Goff JP. Evaluation of breeddependent differences in the innate immune responses of Holstein and Jersey cows to *Staphylococcus aureus* intramammary infection. *J Dairy Sci.* 2008;75(3):291-301.
40. Barber MR, Pantschenko AG, Hinckley LS, Yang TJ. Inducible and constitutive in vitro neutrophil chemokine expression by mammary epithelial and myoepithelial cells. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999;6(6):791-8.
41. Barreiro O, Yanez-Mo M, Serrador JM, Montoya MC, Vicente-Manzanares M, Tejedor R, et al. Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J Cell Biol.* 2002;157(7):1233-45.
42. Barrett KE. Bactericidal activity of mast cells. *Gastroenterology.* 1994;107(3):893-4.
43. Baspinar N., Bas A. L., Haliloglu S., Elmas M., Yazar E.. The effects of intracellular vitamin C concentrations on bovine neutrophils functions in vitro. 1998. *Revue Med. Vet.* 149, 931-938.
44. Basset C, Holton J, O'Mahony R, Roitt I. Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine.* 2003;21 Suppl 2:S12-23.
45. Basu S, Hodgson G, Zhang HH, Katz M, Quilici C, Dunn AR. "Emergency" granulopoiesis in G-CSF-deficient mice in response to *Candida albicans* infection. *Blood.* 2000;95(12):3725-33
46. Batra TR, Singh K, Ho SK, Hidioglou M. Concentration of plasma and milk vitamin E and plasma beta-carotene of mastitic and healthy cows. *Int J Vitam Nutr Res.* 1992;62(3):233-7.
47. Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(7):2804-8.
48. Beckley MS, Johnson T. Five year study of a California mastitis test on a commercial dairy herd. *J Dairy Sci.* 1966;49:746.

49. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BS. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(4):1620-4.
50. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 1996;271(5 Pt 1):C1424-37.
51. Beisel WR. Single nutrients and immunity. *Am J Clin Nutr*. 1982;35(2 Suppl):417-68.
52. Bendich A. Antioxidant Vitamins and Their Functions in Immune Responses. In: Bendich A, Phillips M, Tengerdy RB, editors. *Antioxidant nutrients and their immune functions*. New York: Plenum Publishing Co; 1989. p. 408-21.
53. Bendich A. Ascorbic Acid and Immune Functions. In: Wenk C, Fenster R, Volkerl L, edsitors. *Ascorbic acid in domestic animals*. Zurich: Institut fur Nutzlietw Wissenschaften; 1992.
54. Benhamou M, Gutkind JS, Robbins KC, Siraganian RP. Tyrosine phosphorylation coupled to IgE receptor-mediated signal transduction and histamine release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(14):5327-30.
55. Ben-Sasson SZ, Le Gros G, Conrad DH, Finkelman FD, Paul WE. Cross-linking Fc receptors stimulate splenic non-B, non-T cells to secrete interleukin 4 and other lymphokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(4):1421-5.
56. Berends ETM, Horswill AR, Haste NM, Monestier M, Nizet V, von Kockritz-Blickwede M. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J Innate Immun*. 2010;2(6):576-86.
57. Bergtold A, Desai DD, Gavhane A, Clynes R. Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity*. 2005;23(5):503-14.
58. Bertram TA. Neutrophilic leukocyte structure and function in domestic animals. *Adv Vet Sci Comp Med*. 1985;30:91-129.
59. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*. 2007;81(1):1-5.
60. Bird JJ, Brown DR, Mullen AC, et al. Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity*. 1998;9(2):229-37.
61. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:189-220.
62. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008;(2):CD007176.
63. Black WD, Hidiroglou M. Pharmacokinetic study of ascorbic acid in sheep. *Can J Vet Res*. 1996;60(3):216-21.
64. Blackburn PS. The variation in cell count of cow's milk throughout lactation and from one lactation to the next. *J Dairy Res*. 1966;33(2):193-8.
65. Blank IH. Futher observations on factors with influence the wather content of the Stratum Corneum. *J Investig Dermatol*. 1953;21(4):259-71.

66. Blank U, Ra C, Miller L, White K, Metzger H, Kinet JP. Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor. *Nature*. 1989;337(6203):187-9.
67. Blood DC, Henderson J, Radostits O. *Medicina Veterinaria*. 6' ed. español. Nueva Editorial Interamericana; 1988.
68. Boboš S, Vidić B. Preventiva i terapija mastitisa. Zbornik radova Simpozijuma Mastitis i kvalitet mleka; 2001 Maj 30-Jun 02; Vrnjačka Banja, Srbija; 2001. p. 61-66.
69. Bochner BS, Schleimer RP. Mast cells, basophils, and eosinophils: distinct but overlapping pathways for recruitment. *Immunol Rev*. 2001;179:5-15.
70. Bochsler PN, Slauson DO. Inflammation and repair of tissue. In: Slauson DO, Cooper BJ, editors. *Mechanisms of disease: a textbook of comparative general pathology*. 3rd ed. St. Louis: Mosby; 2002: 140-245.
71. Boddie RL, Nickerson SC, Adkinson RW. Evaluation of teat germicides of low iodine concentrations for prevention of bovine mastitis by *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. *Prev Vet Med*. 1993;16(2):111-7.
72. Boddie RL, Nickerson SC, Adkinson RW. Germicidal activity of a chlorous acid-chlorine dioxide teat dip and a sodium chlorite teat dip during experimental challenge with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. *J Dairy Sci*. 1998;81(8):2293-8.
73. Bogunovic M, Ginhoux F, Helft J, et al. Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity*. 2009;31(3):513-25.
74. Bohlson SS, O'Conner SD, Hulsebus HJ, Ho M-M, Fraser DA. Complement, C1q, and C1q-related molecules regulate macrophage polarization. *Front Immunol*. 2014;5:402.
75. Bojanić Rašović M. Mastitis krava i njegov značaj [Internet]; 2012 [cited 2015 Nov 9]. Available from: http://www.btf.ucg.ac.me/materijal/1386576914mastitis_i_njegov_znacaj_30.01.2012.pdf.
76. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S33-40.
77. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010;33(5):657-70.
78. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. 1997;89(10):3503-21.
79. Borregaard N, Lollike K, Kjeldsen L, et al. Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur J Haematol*. 1993;51(4):187-98.
80. Borregaard N, Sehested M, Nielsen BS, Sengelov H, Kjeldsen L. Biosynthesis of granule proteins in normal human bone marrow cells. Gelatinase is a marker of terminal neutrophil differentiation. *Blood*. 1995;85(3):812-7.
81. Borregaard N, Tauber AI. Subcellular localization of the human neutrophil NADPH oxidase. b-Cytochrome and associated flavoprotein. *J Biol Chem*. 1984;259(1):47-52.
82. Bouda J, Jagos P, Dvorak R, Ondrova J. Vitamin E and C in the blood plasma of cows and their calves fed from buckets. *Acta Vet Brno*. 1980;49(1-2):53-8.

83. Boudjellab N, Chan-Tang HS, Li X, Zhao X. Interleukin 8 response by bovine mammary epithelial cells to lipopolysaccharide stimulation. *Am J Vet Res.* 1998;59(12):1563-7.
84. Bozonet S. M., Carr A. C., Pullar J. M., Vissers M. C. M. . Enhanced human neutrophil vitamin C status, chemotaxis and oxidant generation following dietary supplementation with vitamin C-rich SunGold *kiwifruit*. *Nutrients*, 2015. 7(4).
85. Boyce JA, Friend D, Matsumoto R, Austen KF, Owen WF. Differentiation *in vitro* of hybrid eosinophil/basophil granulocytes: autocrine function of an eosinophil developmental intermediate. 1995.*J Exp Med* 182: 49-57.
86. Božičković R. Gangrenozni mastitisi krava [master rad]. Novi Sad (Srbija): Univerzitet u Novom Sadu - Poljoprivredni fakultet - Departman veterinarske medicine; 2014.
87. Bradley LM. Migration and T-lymphocyte effector function. *Curr Opin Immunol.* 2003;15(3):343-8.
88. Bramley AJ. Mastitis physiology or pathology? *FlemVet J.* 1991;62(1):3-11.
89. Brandstadter JD, Yang YP. Natural killer cell responses to viral infection. *J Innate Immun.* 2011;3(3):274-9.
90. Bratton DL, Henson PM. Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. *Trends Immunol.* 2011;32(8):350-7.
91. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-5.
92. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol.* 2012;198(5):773-83.
93. Brolund L. Cell counts in bovine milk. Causes of variation and applicability for diagnosis of subclinical mastitis. *Acta Vet Scand Suppl.* 1985;80:1-123.
94. Brown MB, Scasserra AE. Antimicrobial resistant in streptococcal species isolated from bovine mammary gland. *Am J Vet Res.* 1990;51(12):2015-8.
95. Brown SJ, Barker RW, Askenase PW. Bovine resistance to *Amblyomma americanum* ticks: an acquired immune response characterized by cutaneous basophil infiltrates. *Vet Parasitol.* 1984;16(1-2):147-65.
96. Brun - Hansen H, Gronstol H, Hardeng F. Experimental infection with *Ehrlichia phagocytophila* in cattle. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1998;45(4):193-203.
97. Brun - Hansen HC, Kampen AH, Lund A. Hematologic values in calves during the first 6 months of life. *Vet Clin Pathol.* 2006;35(2):182-7.
98. Buckley CD, Ross EA, McGettrick HM, Osborne CE, Haworth O, Schmutz C, et al. Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived, neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *J Leukoc Biol.* 2006;79(2):303-11.
99. Bugl S, Wirths S, Müller MR, Radsak MP, Kopp HG. Current insights into neutrophil homeostasis. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1266:171-8.
100. Bugl, S., Wirths, S., Radsak, M.P. et al. Steady-state neutrophil homeostasis is dependent on TLR4/TRIF signaling. *Blood.* 2013;121:723–733.
101. Bullen JJ, Rogers HJ, Leigh L. Iron-binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infection in infants. *Br Med J.* 1972;1(5792):69-75.

102. Burdon PC. Migration across the sinusoidal endothelium regulates neutrophil mobilization in response to ELR + CXC chemokines. *Br J Haematol.* 2008;142(1):100-8.
103. Burns SM, Hull SI. Loss of resistance to ingestion and phagocytic killing by O (-) and K (-) mutants of a uropathogenic *Escherichia coli* O75: K5 strain. *Infect Immun.* 1999;67(8):3757-62.
104. Burvenich C, van Merris V, Mehrzad J, DiezFraille A, Duchateau L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res.* 2003;34(5):521-64.
105. Butterworth AE. Cell-mediated damage to helminths. *Adv Parasitol.* 1984;23:143-235.
106. Callahan GN, Ya RM. *Basic Veterinary Immunology.* USA: University Press of Colorado; 2014.
107. Calsamiglia S, Rodriguez M. Optimum vitamin nutrition in dairy cattle. In: *Optimum vitamin nutrition in the production of quality animal foods.* UK: 5M Publishing; 2012. p. 335-85.
108. Campanelli D, Detmers PA, Nathan CF, Gabay JE. Azurocidin and a homologous serine protease from neutrophils. Differential antimicrobial and proteolytic properties. *J Clin Invest.* 1990;85(3):904-15.
109. Campanelli D, Melchior M, Fu Y, Nakata M, Shuman H, Nathan C, et al. Cloning of cDNA for proteinase 3: a serine protease, antibiotic, and autoantigen from human neutrophils. *J Exp Med.* 1990;172(6):1709-15.
110. Canonne-Hergaux F, Calafat J, Richer E, Cellier M, Grinstein S, Borregaard N, et al. Expression and subcellular localization of NRAMP1 in human neutrophil granules. *Blood.* 2002;100(1):268-75.
111. Cappa C. Le métabolisme de la vitamine C chez ruminants. *Riv Zootech.* 1958;31:299-308.
112. Carlin JM, Borden EC, Sondel PM, Byrne GI. Interferon induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol.* 1989;45(1):29-34.
113. Carlson GP, Kaneko J. Intravascular granulocyte kinetics in developing calves. *Am J Vet Res.* 1975;36(4 Pt.1):421-5.
114. Carman CV, Springer TA. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol.* 2004;167(2):377-88.
115. Carr A. C., McCall M. R., Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. 2000. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, vol. 20, no. 7, pp. 1716–1723
116. Carter EW, Kerr DE. Optimization of DNA-based vaccination on cows using green fluorescent protein and protein A as a prelude to immunization against staphylococcal mastitis. *J Dairy Sci.* 2003;86(4):1177-86.
117. Carvalho-Tavares J, Hickey MJ, Hutchison J, Michaud J, Sutcliffe IT, Kubes P. A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor- α -induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature. *Circ Res.* 2000;87(12):1141-8.
118. Casolaro V, Spadaro G, Marone G. VI. Changes in Basophil Releasability in Patients with Allergic Rhinitis or Bronchial Asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1990;142(5):1108-11.

119. Cassatella MA. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol.* 1999;73:369-509.
120. Castellino F, Germain RN. Extensive trafficking of MHC class II-invariant chain complexes in the endocytic pathway and appearance of peptide-loaded class II in multiple compartments. *Immunity.* 1995;2(1):73-88.
121. Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol.* 2001;1(1):41-9.
122. Chaiyotwittayakun A, Erskine RJ, Bartlett PC, Herdt TH, Sears PM, Harmon RJ. The effect of ascorbic acid and L-histidine therapy on acute mammary inflammation in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2002;85(1):60-7.
123. Cham BP, Gerrard JM, Bainton DF. Granulophysin is located in the membrane of azurophilic granules in human neutrophils and mobilizes to the plasma membrane following cell stimulation. *Am J Pathol.* 1994;144(6):1369-80.
124. Chanda R. The effect of thyroxine on phosphatase, ascorbic acid and tocopherol content in the blood and milk of the cow and the buffalo. *Curr Sci.* 1958;27(3):102-4.
125. Chapple DS, Mason DJ, Joannou CL, Odell EW, Gant V, Evans RW. Structure-function relationship of antibacterial synthetic peptides homologous to a helical surface region on human lactoferrin against *Escherichia coli* serotype O111. *Infect Immun.* 1998;66(6):2434-40.
126. Chatterjee IB. Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid. *Science.* 1973;182(4118):1271-2.
127. Chatterjee IB. Ascorbic acid metabolism. *World Rev Nutr Diet.* 1978;30:69-87.
128. Chen Y, Junger WG. Measurement of oxidative burst in neutrophils. *Methods Mol Biol.* 2012;844:115-24.
129. Chen Z, Tato CM, Muul L, Laurence A, O'Shea JJ. Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. *Arthritis Rheum.* 2007;56(9):2936-46.
130. Cherry WB, Yoon J, Bartemes KR, Iijima K, Kita H. A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(6):1484-90.
131. Chertov O, Michiel DF, Xu L, Wang JM, Tani K, Murphy WJ, et al. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J Biol Chem.* 1996;271(6):2935-40.
132. Chew BP, Hollen LL, Hillers JK, Herlugson ML. Relationship between vitamin A and beta-carotene in blood plasma and milk and mastitis in Holsteins. *J Dairy Sci.* 1982;65(11):2111-8.
133. Christopher MJ, Liu F, Hilton MJ, Long F, Link DC. Suppression of CXCL12 production by bone marrow osteoblasts is a common and critical pathway for cytokine-induced mobilization. *Blood.* 2009;114(7):1331-9.
134. Church MK, Levi Schaffer F. The human mast cell. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;99(2):155-60.
135. Cicchetti G, Allen PG, Glogauer M. Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(3):220-8.

136. Cieutat AM, Lobel P, August JT, Kjeldsen L, Sengelov H, Borregaard N, et al. Azurophilic granules of human neutrophilic leukocytes are deficient in lysosome-associated membrane proteins but retain the mannose 6-phosphate recognition marker. *Blood*. 1998;91(3):1044-58.
137. Clark RA. Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J Infect Dis*. 1999;179 Suppl 2:S309-17.
138. Clark S. Comparing milk: human, cow, goat and commercial infant formula. Washington State University; 2007 [cited 2015 Nov 9]. Available from: <http://www.saanendoah.com/compare.html>.
139. Cline MJ. Production, destruction, and distribution of neutrophilic granulocytes. In: Cline MJ, editor. *The white cell*. Cambridge: Harvard University Press; 1975: 24-38.
140. Cole CL, Rasmussen RA, Thorp F. Ascorbic acid deficiency in cow. *Vet Med*. 1944;39: 204.
141. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood*. 1992;80(8):2012-20.
142. Competition Commission [Internet]. The production of vitamin C. Appendix 4.2; 2001 [cited 2015 Nov 9]. Available from: <http://www.roccomanzi.it/IMP-VITAMINERALI/VITAMINA%20C/VIT%20C%20PRODUZ/prodvitC-456a4.2.pdf>.
143. Conboy GA, Stromberg BE. Hematology and clinical pathology of experimental *Fascioloides magna* infection in cattle and guinea pigs. *Vet Parasitol*. 1991;40(3-4):241-55.
144. Coon JS, Landay AL, Weinstein RS. Advances in flow cytometry for diagnostic pathology. *Lab Invest*. 1987;57(5):453-79.
145. Coquillard G, Patterson BK. Determination of hepatitis C virus-infected, monocyte lineage reservoirs in individuals with or without HIV coinfection. *J Infect Dis*. 2009;200(6):947-54.
146. Cowland JB, Johnsen AH, Borregaard N. hCAP-18, a cathelin/probactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett*. 1995;368(1):173-6.
147. Cox D, Berg JS, Cammer M, Chingwundoh JO, Dale BM, Cheney RE, et al. Myosin X is a downstream effector of PI(3)K during phagocytosis. *Nat Cell Biol*. 2002;4:469-77.
148. Cramer E, Pryzwansky KB, Villeval JL, Testa U, Breton-Gorius J. Ultrastructural localization of lactoferrin and myeloperoxidase in human neutrophils by immunogold. *Blood*. 1985;65(2):423-32.
149. Craven N. Efficacy and financial value of antibiotic treatment of bovine clinical mastitis during lactation. *Br Vet J*. 1987;143(5):410-22.
150. Craven N, Williams MR. Defenses of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancements. *Vet Immunol Immunopathol*. 1985;10(1):71-127.
151. Croft M, Duncan DD, Swain SL. Response of naive antigen-specific CD4+ T cells *in vitro*: Characteristics and antigen presenting requirements. *J Exp Med*. 1992;176(5):1431-7.

152. Crofton RW, Diesselhoff-den Dulk MM, van Furth R. The origin, kinetics, and characteristics of the Kupffer cells in the normal steady state. *J Exp Med.* 1978;148(1):1-17.
153. Cromwell GL, Hays VW, Overfield JR. Effect of dietary ascorbic acid on performance and plasma cholesterol levels of growing swine. *J Anim Sci.* 1970;31(1):63-6.
154. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, et al. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity.* 2010;33(3):375-86.
155. Cross AR, Segal AW. The NADPH oxidase of professional phagocytes-prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1657(1):1-22.
156. Crowley MT, Costello PS, Fitzer-Attas CJ, Turner M, Meng F, Lowell C, et al. A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fcγ receptors on macrophages. *J Exp Med.* 1997;186(7):1027-39.
157. Cruvinel WM, Mesquita D, Jr, Araujo JAP, Salmazi KC, Kállas EG, Andrade LEC. Natural regulatory T cells in rheumatic diseases. *Rev. Bras. Reumatol.* 2008;48(6):342-55.
158. Cumberbatch M, Dearman RJ, Griffiths CE, Kimber I. Langerhans cell migration. *Clin Exp Dermatol.* 2000;25(5):413-8.
159. Cummins KA. Ascorbate in cattle: A review. *Proc Anim Sci.* 1989;8:22-9.
160. Cummins KA, Brunner CJ. Dietary ascorbic acid and immune response in dairy calves. *J Dairy Sci.* 1989;72(1):129-34.
161. Cummins KA, Brunner CJ. Effect of calf housing on plasma ascorbate and endocrine and immune functions. *J Dairy Sci.* 1991;74(5):1582-8.
162. Cummins K. A., Brunner C. J., Tyler P. J.. Effect of dietary ascorbate, alphatocopherol and colostrum on immune function in calves of either sex. 1992. *J. Dairy Sci.* 75(Suppl.):274.
163. Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(3):470-511.
164. Daher KA, Selsted ME, Lehrer RI. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J Virol.* 1986;60(3):1068-74.
165. Dahlberg AC, Kucera JJ, Hening JC, Hucker G. Mastitis IV. The composition of milk as affected by latent mastitis. *New York State Agricultural Experiment Station Technical Bulletin;* 1936: 239.
166. Dahlgren C, Karlsson A. Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods.* 1999;232(1-2):3-14.
167. Dahms NM, Lobel P, Kornfeld S. Mannose 6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting. *J Biol Chem.* 1989;264(21):12115-8.
168. Dalbeth N, Gundle R, Davies RJO, Lee YCG, McMichael AJ, Callan MFC. CD56bright NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation. *J Immunol.* 2004;173(10):6418-26.
169. Dale DC, Hubert RT, Fauci AS. Eosinophil kinetics in the hypereosinophilic syndrome. *J Lab Clin Med.* 1976;87(3):487-95.

170. Darrah E, Andrade F. NETs: the missing link between cell death and systemic auto-immune diseases? *Front Immunol.* 2013;3:428.
171. David F, LaRosa MD, Orange JS. Lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(2 Suppl 2):S364–S369.
172. De Haas CJ, Veldkamp KE, Peschel A, Weerkamp F, van Wamel WJ, Heezius EC, et al. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *J Exp Med.* 2004;199(5):687-95.
173. DeChatelet LR, Cooper RM, McCall CE. Stimulation of the hexose monophosphate shunt in human neutrophils by ascorbic acid: Mechanism of action. *Antimicrob Agents Chemother.* 1972;1(1):12-6.
174. Decoursey TE, Ligeti E. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(19-20):2173-93.
175. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med.* 2000;343(1):37-49.
176. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med.* 2000;343(2):108-17.
177. Delves P, Roitt I (eds). *Encyclopedia of Immunology.* 2nd Ed. San Diego: Academic Press; 1998.
178. De-Rodas BZ, Maxwell CV, Davis ME, Mandali S, Broekman E, Stoecker BJ. L-ascorbyl-2-polyphosphate as a vitamin C source for segregated and conventionally weaned pigs. *J Anim Sci.* 1998;76(6):1636-43.
179. Detmers PA, Zhou D, Powell D, Lichenstein H, Kelley M, Pironkova R. Endotoxin receptors (CD14) are found with CD16 (Fc gamma RIII) in an intracellular compartment of neutrophils that contains alkaline phosphatase. *J Immunol.* 1995;155(4):2085-95.
180. Diez-Fraille A, Mehrzad J, Meyer E, Duchateau L, Burvenich C. Comparison of L-selectin and Mac-1 expression on blood and milk neutrophils during experimental *Escherichia coli*-induced mastitis in cows. *Am J Vet Res.* 2004;65(8):1164-71.
181. Dobsinska E, Sova Z, Kopak V, Trhon M. Relations among glycemia, ascorbemia and weight gains in calves in a large-capacity calfhouse. *Vet Med Praha.* 1981;26:203.
182. Dohoo IR, Meek AH. Somatic cell counts in bovine milk. *Can Vet J.* 1982;23(4):119-125.
183. Đoković RD, Cincović MP, Belić BM. Fiziologija i patofiziologija metabolizma krava u peripartalnom periodu. Novi Sad: Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Novom Sadu; 2014.
184. Dong ZM, Murphy JW. Cryptococcal polysaccharides induce 1-selectin shedding and tumor necrosis factor receptor loss from the surface of human neutrophils. *J Clin Invest.* 1996;97(3):689-98.
185. Donohue DM. Quantitative measurement of the erythrocytic and granulocytic cells of the marrow and blood. *J Clin Invest.* 1958;37(11):1571-6.
186. Dore E, Fedteau G, Helie P, et al. Liver abscesses in Holstein dairy cattle:18 cases (1992-2003). *J Vet Intern Med.* 2007;21(4):853-6.

187. Dosogne H, Burvenich C, Freeman AE, et al. Pregnancy - associated glycoprotein and decreased polymorphonuclear leukocyte function in early post - partum dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999;67:47–54.
188. Douglas RM, Hemila H, D'Souza R, Chalker EB, Treacy B. Vitamin C for preventing and treating the common cold. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004;(4):CD000980.
189. Drechsler M, Megens RT, van Zandvoort M, Weber C, Soehnlein O. Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. *Circulation.* 2010;122(18):1837-45.
190. Duncan CW. Studies on the influence of ascorbic acid in calves with scurvy. *J Dairy Sci.* 1944;27:636.
191. Dvorak AM, Ackerman SJ, Weller PF. Subcellular morphology and biochemistry of eosinophils. In: *Blood cell biochemistry.* Vol. 2. New York: Plenum Press; 1991: 237-344.
192. Dvorak AM, Monahan RA. Guinea - pig bone marrow basophilopoiesis. *J Exp Pathol.* 1985;2(1):13-24.
193. Dvorak M. Blood serum L-ascorbic acid in calves fed with 2% fat. *Vet Med Praha.* 1964;9:471.
194. e Sousa CR. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(6):476-83.
195. Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest.* 2010;120(7):2423-31.
196. Eash KJ, Means JM, White DW, Link DC. CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood.* 2009;113(19):4711-9.
197. Eberhart RJ, Hutchinson LJ, Spenser SB. Relationships of milking rate to somatic cell counts to prevalence of intramammary infection and to indices of herd production. *J Food Prot.* 1982;45:1125-8.
198. Edwards SW, Say JE, Hughes V. Gamma interferon enhances the killing of *Staphylococcus aureus* by human neutrophils. *J Gen Microbiol.* 1988;134(1):37-42.
199. Egesten A, Breton-Gorius J, Guichard J, Gullberg U, Olsson I. The heterogeneity of azurophil granules in neutrophil promyelocytes: immunogold localization of myeloperoxidase, cathepsin G, elastase, proteinase 3, and bactericidal/permeability increasing protein. *Blood.* 1994;83(10):2985-94.
200. Eggleton P, Tenner AJ, Reid KB. C1q receptors. *Clin Exp Immunology.* 2000;120: 406-12.
201. Ehlers MR. CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. *Microbes Infect.* 2000;2(3):289-94.
202. Eicher-Prueett SD, Morrill JL, Blecha F, Higgins JJ, Anderson NV, Reddy PG. Neutrophil and lymphocyte response to supplementation with vitamins C and E in young calves. *J Dairy Sci.* 1992;75(6):1635-42.
203. Ekman AK, Cardell LO. The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils. *Immunology.* 2010;130(1):55-63.

204. El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol.* 2008;30(3):279-89.
205. Elks PM, van Eeden FJ, Dixon G, Wang X, Reyes-Aldasoro CC, Ingham PW, et al. Activation of hypoxia-inducible factor-1 α (Hif-1 α) delays inflammation resolution by reducing neutrophil apoptosis and reverse migration in a zebrafish inflammation model. *Blood.* 2011;118(3):712-22.
206. Ellerbroek PM, Ulfman LH, Hoepelman AI, Coenjaerts FE. Cryptococcal glucuronoxylomannan interferes with neutrophil rolling on the endothelium. *Cell Microbiol.* 2004;6(6):581-92.
207. Ellis TN, Beaman BL. Interferon-gamma activation of polymorphonuclear neutrophil function. *Immunology.* 2004;112(1):2-12.
208. El-Rashidy AA, Fox LK, Gay MJ. Diagnosis of *Staphylococcus aureus* intramammary infection by detection of specific antibody titer in milk. *J Dairy Sci.* 1992;75(6):1430-5.
209. Elsas PX, Elsas MI. Eosinophilopoiesis at the cross - roads of research on development, immunity and drug discovery. *Curr Med Chem.* 2007;14(18):1925-39.
210. Elsbach P. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in antibacterial host defense. *J Leukoc Biol.* 1998;64(1):14-8.
211. Erb C, Nau-Staudt, Flammer J, Nau W. Ascorbic acid as a free radical scavenger in porcine and bovine aqueous humour. *Ophthalmic Res.* 2004;36(1):38-42.
212. Erskine RJ, Eberhart RJ, Hutchinson LJ, Scholz RW. Blood selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in dairy herds with high and low somatic cell counts. *J Am Vet Med Assoc.* 1987;190(11):1417-21.
213. Erskine RJ, Eberhart VMD, Grasso MS, Scholz RW. Induction of *Escherichia coli* mastitis in cows fed selenium-deficient or selenium-supplemented diets. *Am J Vet Res.* 1989;50(12):2093-99.
214. Erskine RJ, Kirk JH, Tyler JW, Degraives FJ. Advances in the therapy for mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1993;9(3):499-517.
215. Evans RM, Currie L, Campbell A. The distribution of ascorbic acid between various cellular components in normal individuals, and its relation to the plasma concentration. 1982. *Br J Nutr* 47:473-842
216. Ezekowitz RA, Gordon S. Alterations of surface properties by macrophage activation: expression of receptors for Fc and mannoseterminal glycoproteins and differentiation antigens. *Contemp Top Immunobiol.* 1984;13:33-56.
217. Faellman M, Lew DP, Stendahl O, Andersson T. Receptor-mediated phagocytosis in human neutrophils is associated with increased formation of inositol phosphates and diacylglycerol. Elevation in cytosolic free calcium and formation of inositol phosphates can be dissociated from accumulation of diacylglycerol. *J Clin Invest.* 1989;84(3):886-91.
218. Fahy RJ, Doseff AI, Wewers MD. Spontaneous human monocyte apoptosis utilizes a caspase-3-dependent pathway that is blocked by endotoxin and is independent of caspase-1. *J Immunol.* 1999;163(4):1755-62.

219. Falcone FH, Zillikens D, Gibbs BF. The 21st century renaissance of the basophil? Current insights into its role in allergic responses and innate immunity. *Exp Dermatol*. 2006;15(11):855-64.
220. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*. 2003;5(14):1317-27.
221. Faurschou M, Sørensen OE, Johnsen AH, Askaa J, Borregaard N. Defensin-rich granules of human neutrophils: Characterization of secretory properties. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1591(1-3):29-35.
222. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*. 1996;272(5258):50-3.
223. Feuk-Lagerstedt E, Samuelsson M, Mosgoeller W, Movitz C, Rosqvist A, Bergstrom J, et al. The presence of stomatin in detergent-insoluble domains of neutrophil granule membranes. *J Leukoc Biol*. 2002 Nov;72(5):970-7.
224. Finkel-Jimenez B, Wuthrich M, Klein BS. BAD1, an essential virulence factor of *Blastomyces dermatitidis*, suppresses host TNF-alpha production through TGF-beta-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol*. 2002;168(11):5746-55.
225. Fjaertoft G, Hakansson LD, Pauksens K, Sisask G, Venge P. Neutrophil CD64 (FcgammaRI) expression is a specific marker of bacterial infection: a study on the kinetics and the impact of major surgery. *Scand J Infect Dis*. 2007;39(6-7):525-35.
226. Flannagan RS, Jaumouille V, Grinstein S. The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol*. 2012;7:61-98.
227. Flodgaard H, Ostergaard E, Bayne S, Svendsen A, Thomsen J, Engels M, et al. Covalent structure of two novel neutrophil leucocyte-derived proteins of porcine and human origin. Neutrophil elastase homologues with strong monocyte and fibroblast chemotactic activities. *Eur J Biochem*. 1991;197(2):535-47.
228. Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, et al. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science*. 2006;311(5757):83-7.
229. Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(12):948-58.
230. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Hook M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(1):49-62.
231. Fournier BM, Parkos CA. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol*. 2012;5(4):354-66.
232. Fox LK, Adams DS. The ability of enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibody against *Staphylococcus aureus* in milk following experimental intramammary infection. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2000;47(7):517-26.
233. Fradin C, De Groot P, MacCallum D, Schaller M, Klis F, Odds FC, et al. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol*. 2005;56(2):397-415.
234. Frerking H. Zur Feststellung von Enterstörungen und Enteren-t zündungen in Vorzugsmilchbetrie ben unter Verwendung geeigneter Laboratoriumsverfahren. Hanover: The University of Veterinary Medicine; 1961.

235. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., Weinrauch Y., Brinkmann V., Zychlinsky A. (2007): Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007;176(2):231-41.
236. Furuta T, Kikuchi T, Iwakura Y, Watanabe N. Protective roles of mast cells and mast cell-derived TNF in murine malaria. *J Immunol.* 2006;177(5):3294-302.
237. Futosi K., Fodor S., Mocsai A. (2013): Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol.* 2013;17(3):638-50.
238. Ganz T, Lehrer R. Production, distribution, and fate of monocytes and macrophages. In: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, et al, editors. *William's hematology.* 7th ed. New York: McGraw-Hill; 2006: 979-82.
239. Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest.* 1985;76(4):1427-35.
240. Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med.* 2011;3(73):73ra20.
241. Garwicz D, Lindmark A, Persson AM, Gullberg U. On the role of the proform-conformation for processing and intracellular sorting of human cathepsin G. *Blood.* 1998;92(4):1415-22.
242. Gautam N, Olofsson AM, Herwald H, Iversen LF, Lundgren Akerlund E, Hedqvist P, et al. Heparin-binding protein (HBP/CAP37): a missing link in neutrophil-evoked alteration of vascular permeability. *Nat Med.* 2001;7(10):1123-7.
243. Geering B, Stoeckle C, Conus S, Simon HU. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends Immunol.* 2013;34(8):398-409.
244. Geissmann F, Gordon S, Hume DA, Mowat AM, Randolph GJ. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(6):453-60.
245. Geissmann F, Launay P, Pasquier B, Lepelletier Y, Leborgne M, Lehen A, et al. A subset of human dendritic cells expresses IgA Fc receptor (CD89), which mediates internalization and activation upon cross-linking by IgA complexes. *J Immunol.* 2001;166(1):346-52.
246. Genestier AL, Michallet MC, Prevost G, Bellot G, Chalabreysse L, Peyrol S, et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest.* 2005;115(11):3117-27.
247. George JW, Lane VM, Snipes JN. Changes in bovine hematology reference intervals from 1965 to 2001. *Vet Clin Pathol.* 2008;36:313.
248. Gerber WF. Effect of ascorbic acid, sodium salicylate and caffeine on the serum interferon level in response to viral infection. *Pharmacology.* 1975;13(3):228-33.
249. Gillet N, Florins A, Boxus M, et al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology.* 2007;4:18.
250. Gleich GJ. The functions of eosinophils. *Ann Inst Pasteur Immunol.* 1986;137D(1):136-41.

251. Gleich GJ, Adolphson CR. The eosinophilic leukocyte: structure and function. *Adv Immunol.* 1986;39:177-253.
252. Gleich GJ, Adolphson CR, Leiferman KM. The biology of the eosinophil leukocyte. *Annu Rev Med.* 1993;44:85-101.
253. Goerdt S, Orfanos CE. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity.* 1999;10(2):137-42.
254. Goerdt S, Politz O, Schledzewski K, Birk R, Gratchev A, Guillot P, et al. Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology.* 1999;67(5-6):222-6.
255. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell.* 2002;10(5):1033-43.
256. Goldschmidt MC. Reduced bactericidal activity in neutrophils from scorbutic animals and the effect of ascorbic acid on these target bacteria in vivo and *in vitro*. *Am J Clin Nutr.* 1991;54(6 Suppl):1214S-1220S.
257. González-Cano P, Arsic N, Popowych YI, Griebel PJ. Two functionally distinct myeloid dendritic cell subpopulations are present in bovine blood. *Dev Comp Immunol.* 2014;44(2):378-88.
258. Gordon S. The macrophage: past, present, and future. *Eur J Immunol.* 2007;37 Suppl 1:S9-17.
259. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(12):953-64.
260. Gorgens A, Radtke S, Mollmann M, Cross M, Durig J, Horn PA, et al. Revision of the human hematopoietic tree: granulocyte subtypes derive from distinct hematopoietic lineages. *Cell Rep.* 2013;3(5):1539-52.
261. Govaerts A. Cellular antibodies in kidney homotransplantation. *J Immunol.* 1960;85:516-22.
262. Goyal A, Wang Y, Graham MM, Doseff AI, Bhatt NY, Marsh CB. Monocyte survival factors induce AKT activation and suppress caspase-3. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;26(2):224-30.
263. Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, Politz O, Orfanos CE, Schledzewski K. Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein betaIG-H3. *Scand J Immunol.* 2001;53(4):386-92.
264. Greenberg S, Chang P, Wang DC, Xavier R, Seed B. Clustered syk tyrosine kinase domains trigger phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(3):1103-7.
265. Grinberg N, Elazar S, Rosenshine I, Shpigel NY. β -hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2008;76(6):2802-7.
266. Grove TM, Jones GM. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay to monitor the control of *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci.* 1992;75(2):423-34.
267. Gruner ER, Harmon RJ, Hemken RW. A comparison of antibacterial granule components in neutrophil leukocytes from bovine blood and milk after endotoxin infusion. 1982. *J Dairy Sci*, 65, P194.

268. Gruenheid S, Finlay BB. Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature*. 2003;422(6933):775-81.
269. Gruenheid S, Gros P. Genetic susceptibility to intracellular infections: Nramp1, macrophage function and divalent cations transport. *Curr Opin Microbiol*. 2000;3(1):43-8.
270. Gruneth E. Buiatrik. Hanover: Verlag Schape; 1996.
271. Guidry AJ, O'Brien CN, Oliver SP, Dowlen HH, Douglass LW. Effect of whole *Staphylococcus aureus* and mode of immunization on bovine opsonizing antibodies. *J Dairy Sci*. 1994;77(10):2965-74.
272. Guidry AJ, Paape MJ, Pearson RE, Williams WF. Effect of local immunization of the mammary gland on phagocytosis and intracellular kill of *Staphylococcus aureus* by polymorphonuclear neutrophils. *Am J Vet Res*. 1980;41(9):1427-31.
273. Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, et al. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med*. 1999;189(3):451-60.
274. Hackam DJ, Rotstein OD, Zhang WJ, Demaurex N, Woodside M, Tsai O, et al. Regulation of phagosomal acidification. Differential targeting of Na exchangers, Na⁺/K⁺-ATPases, and vacuolar-type H⁺ ATPases. *J Biol Chem*. 1997;272(47):29810-20.
275. Hadeiba H, Sato T, Habtezion A, Oderup C, Pan J, Butcher EC. CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat Immunol*. 2008;9(11):1253-60.
276. Hagan P, Wilkins HA, Blumenthal UJ, et al. Eosinophilia and resistance to *Schistosoma haematobium* in man. *Parasite Immunol*. 1985;7(6):625-32.
277. Hamann J. Teat tissue resistance mechanisms with special regard to machine milking. In: Proceedings of an International Symposium on Immunology of Ruminant Mammary Gland; 2000 June 11-14; Stresa, Italy. International Dairy Federation; 2000. p. 102-111.
278. Hamann KJ, Barker RL, Ten RM, Gleich GJ. The molecular biology of eosinophil granule proteins. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1991;94(1-4):202-9.
279. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*. 1998;92(9):3007-17.
280. Harmon RJ. Neutrophil leukocyte as a source of lactoferrin in bovine milk. *Am J Vet Res*. 1980;41:1603-6.
281. Harmon RJ. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J Dairy Sci*. 1994;77(7):2103-12.
282. Harris JR. Ascorbic acid: biochemistry and biomedical cell biology. In: Subcellular biochemistry. New York and London: Plenum Press; 1996.
283. Harshyne LA, Watkins SC, Gambotto A, Barratt-Boyes SM. Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J Immunol*. 2001;166(6):3717-23.
284. Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*. 1997;90(9):3245-87.

285. Hartmann J, Sceppek S, Lindau M. Regulation of granule size in human and horse eosinophils by number of fusion events among unit granules. *J Physiol*. 1995;483 (Pt 1):201-9.
286. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. 2003;102(7):2660-9.
287. Hazen SL, D'Avignon A, Anderson MM, Hsu FF, Heinecke JW. Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to oxidize alpha-amino acids to a family of reactive aldehydes. Mechanistic studies identifying labile intermediates along the reaction pathway. *J Biol Chem*. 1998;273(9):4997-5005.
288. He B, Qiao X, Cerutti A. CpG DNA induces IgG class switch DNA recombination by activating human B cells through an innate pathway that requires TLR9 and cooperates with IL-10. *J Immunol*. 2004;173(7):4479-91.
289. Heinecke JW. Is lipid peroxidation relevant to atherogenesis? *J Clin Invest*. 1999;104(2):135-6.
290. Helmy KY, Katschke KJ, Jr, Gorgani NN, Kljavin NM, Elliott JM, Diehl L, et al. CR1g: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell*. 2006;124(5):915-27.
291. Hemila H, Douglas RM. Vitamin C and acute respiratory infections. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1999;3(9):756-61.
292. Hemingway DC. Vitamin C in the prevention of neonatal calf diarrhea. *Can Vet J*. 1991;32(3):184.
293. Hemmers S, Teijaro JR, Arandjelovic S, Mowen KA. PAD4-mediated neutrophil extracellular trap formation is not required for immunity against influenza infection. *PLoS One*. 2011;6(7):e22043.
294. Henz BM, Maurer M, Lippert U, Worm M, Babina M. Mast cells are initiators of immunity and host defense. *Exp Dermatol*. 2001;10(1):1-10.
295. Hernandez PA, Gorlin RJ, Lukens JN, Taniuchi S, Bohinjec J, Francois F, et al. Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet*. 2003;34(1):70-4.
296. Herndon FJ, Kayes SG. Depletion of eosinophils by anti - IL - 5 monoclonal antibody treatment of mice infected with *Trichinella spiralis* does not alter parasite burden or immunologic resistance to reinfection. *J Immunol*. 1992;149(11):3642-7.
297. Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, et al. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines *in vivo*: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol*. 2001;167(11):6533-44.
298. Heufler C, Koch F, Schuler G. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med*. 1988;167(2):700-5.
299. Heyneman R, Burvenich C. Kinetics and characteristics of bovine neutrophil alkaline phosphatase during acute *Escherichia coli* mastitis. *J Dairy Sci*. 1992;75(7):1826-34.
300. Hibbs Jr, JB. Infection and nitric oxide. *J Infect Dis*. 2002;185(Suppl. 1):S9-S17.

301. Hibbs ML, Quilici C, Kountouri N, Seymour JF, Armes JE, et al. Mice lacking three myeloid colony-stimulating factors (G-CSF, GM-CSF, and M-CSF) still produce macrophages and granulocytes and mount an inflammatory response in a sterile model of peritonitis. *J Immunol.* 2007;178(10):6435-43.
302. Hidiroglou M. Technical note: forms and route of vitamin C supplementation for cows. *J Dairy Sci.* 1999;82(8):1831-3.
303. Hidiroglou M, Batra TR, Zhao X. Comparison of vitamin C bioavailability after multiple or single oral dosing of different formulations in sheep. *Reprod Nutr Dev.* 1997;37(4):443-8.
304. Hidiroglou M, Ivan M, Batra TR. Concentrations of vitamin C in plasma and milk of dairy cattle. *Ann Zootech.* 1995;44(4):399-402.
305. Hidiroglou M, Ivan M, Lessard JR. Effects of ration and inside versus outside housing on plasma levels of ascorbic acid, lactic acid, glucose and cholesterol in Hereford steers wintered under practical condition. *Can J Anim Sci.* 1977;57:519-29.
306. Hillerton JE. Summer mastitis - the current position. *Practice.* 1988;10(2):131-7.
307. Hillyer P, Male D. Expression of chemokines on the surface of different human endothelia. *Immunol Cell Biol.* 2005;83(4):375-82.
308. Hirai K, Miyamasu M, Takaishi T, et al. Regulation of the function of eosinophils and basophils. *Crit Rev Immunol.* 1997;17(3-4):325-52.
309. Hirsch JG, Hirsch BI. Paul Ehrlich and the discovery of the eosinophil. In: *The eosinophil in health and disease.* New York: Grune and Stratton; 1980: 3-24.
310. Hivroz C, Chemin K, Turret M, Bohineust A. Crosstalk between T lymphocytes and dendritic cells. *Crit Rev Immunol.* 2012;32(2):139-55.
311. Hoeben D, Burvenich C, Heyneman R. Influence of antimicrobial agents on bactericidal activity of bovine milk polymorphonuclear leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol.* 1997;56(3-4):271-82.
312. Hoeben D, Burvenich C, Heyneman R. Antibiotics commonly used to treat mastitis and respiratory burst of bovine polymorphonuclear leukocytes. *J Dairy Sci.* 1998;81(2):403-10.
313. Hoeben D, Dosogne H, Heyneman R, Burvenich C. Effect of antibiotics on the phagocytotic and respiratory burst activity of bovine granulocytes. *Eur J Pharmacol.* 1997;332(3):289-97.
314. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science.* 1999;284(5418):1313-8.
315. Hogan JS, Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS. Efficacy of a barrier teat dip containing 0.55% chlorhexidine for prevention of bovine mastitis. *J Dairy Sci.* 1995;78(11):2502-6.
316. Hogan JS, Weiss WP, Todhunter DA, Smith KL, Schoenberg PS. Bovine neutrophil responses to parenteral vitamin E. *J Dairy Sci.* 1992;75(2):399-405.
317. Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy.* 2008;38(5):709-50.
318. Holers VM. Complement and its receptors: new insights into human disease. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:433-59.

319. Hong W, Juneau RA, Pang B, Swords WE. Survival of bacterial biofilms within neutrophil extracellular traps promotes nontypeable *Haemophilus influenza* persistence in the chinchilla model for otitis media. *J Innate Immun.* 2009;1(3):215-24.
320. Horie S, Okubo Y, Hossain M, Sato E, Nomura H, Koyama S, et al. Interleukin-13 but not interleukin-4 prolongs eosinophil survival and induces eosinophil chemotaxis. *Intern Med.* 1997;36(3):179-85
321. Hristov S, Anojčić B. Prilog poznavanju učestalosti pojavljivanja i mere sprečavanja pojave mastitisa kod krava. *Arhiv za poljoprivredne nauke.* 1998;59(208):73-83.
322. Hristov S, Lazarević N, Radovanović M, Radovanović M. Streptokokni mastitis krava. *Zbornik naučnih radova Instituta PKB Agroekonomik.* 1997;3:415-24.
323. Hristov S, Stanković BM, Relić R. Broj somatskih ćelija i mikroorganizama u mleku krava. *Biotech Anim Husbandry.* 2002;18:145-51.
324. Hristov S, Stanković BM, Relić R. Clinical and subclinical mastitis in cows. *Biotech Anim Husbandry.* 2005;21(1-2):29-39.
325. Respiratory burst [Internet]. [cited 2002 Jul 9]. Available from:http://en.wikipedia.org/wiki/Respiratory_burst
326. Vitamin_C_daily_requirements [Internet]. [cited 2015 Nov 9]. Available from:http://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_C#Daily_requirements.
327. Figure 10 [Internet]. [cited 2015 Nov 9]. Available from:http://nongae.gsnu.ac.kr/~cspark/teaching/images/fig_10_1.gif.
328. Ascorbic acid [Internet]. [cited 2015 Nov 9]. Available from:http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ascorbic_acid#section=Top.
329. Dobri stari vitamin C [Internet]. [cited 2015 Nov 9]. Available from:<http://www.adiva.hr/dobri-stari-vitamin-c.aspx>.
330. Vitamin C [Internet]. [cited 2015 Nov 9]. Available from:http://www.dsm.com/markets/anh/en_US/Compendium/ruminants/vitamin_C.html.
331. Respiratory burst & lang [Internet]. [cited 2015 Nov 9]. Available from:http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=respiratory%20burst&lang=1.
332. Inflamacija [Internet]. [cited 2015 Nov 9]. Available from:<http://www.vet.bg.ac.rs/~patofiziologija/pdf/inflamacija.pdf>.
333. Vitamin C [Internet]. [cited 2015 Nov 9]. Available from:<http://www.vitaminologija.com/vitamin-c/>.
334. Huether SE, McCance KL. *Understanding Pathophysiology.* 5th ed. St. Louis, MI: Mosby Inc; 2013.
335. Imlah, P. A study of ascorbic acid in normal and ketotic cows. 1961. *J. Comp. Path.* 71, 28-43
336. Inaba K, Steinman RM, Pack MW, Aya H, Inaba M, Sudo T, et al. Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. *J Exp Med.* 1992;175(5):1157-67.

337. Iovine NM, Elsbach P, Weiss J. An opsonic function of the neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein depends on both its N- and C-terminal domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(20):10973-8.
338. Ito T, Smrž D, Jung MY, Bandara G, Desai A, Smržová Š, et al. Stem cell factor programs the mast cell activation phenotype. *J Immunol*. 2012;188(11):5428-37.
339. Itze L. Ascorbic acid metabolism in ruminants. In: Wegger I, Tagwerker FJ, Moustgaard J, editors. *Proceedings of the Workshop on Ascorbic Acid in Domestic Animals*. Copenhagen: The Royal Danish Agricultural Society; 1984. p. 126.
340. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004;5(10):987-95.
341. Jacobsen EA, Taranova AG, Lee NA, et al. Eosinophils: singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(6):1313-20.
342. Jacobsen LC, Theilgaard-Mönch K, Christensen EI, Borregaard N. Arginase 1 is expressed in myelocytes/metamyelocytes and localized in gelatinase granules of human neutrophils. *Blood*. 2007;109(7):3084-7.
343. Jagos P., Bouda J., Dvorak R. (): The ascorbic acid level in case of bronchopneumonia of calves. *Vet Med Praha*. 1977;22:133-6.
344. Jaillon S, Peri G, Delneste Y, Fremaux I, Doni A, Moalli F, et al. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J Exp Med*. 2007;204(4):793-804.
345. Jain N. Interpretation of leukocyte parameters. In: *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993.
346. Jain NC. *Schalm's Veterinary hematology*. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1986.
347. Jain NC. The eosinophils. In: *Schalm's veterinary hematology*. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1986: 731-55.
348. Jakovac M, Mašek Z. Poremećena sekrecija vimena. *Mljekarstvo*. 1971;21:104-8.
349. Janeway CA. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today*. 1992;13(1):11-6.
350. Jann NJ, Schmalzer M, Ferracin F, Landmann R. TLR2 enhances NADPH oxidase activity and killing of *Staphylococcus aureus* by PMN. *Immunol Lett*. 2011;135(1-2):17-23.
351. Jazbec I. Klinično laboratorijska diagnostika, vrednosti ter interpretacija hematološkega in biokemijskega profila pri domačih živali, 1990. Univerza Edvarda Kardelja v Ljubljani, Veterinarska Fakulteta, Ljubljana
352. Jenne CN, et al. Intravital visualization of a protective innate immune response to challenge from an acute viral infection. *Cell Host Microbe*. Forthcoming 2016.
353. Jensen DL, Eberhart RJ. Total and differential cell counts in secretions of the nonlactating bovine mammary gland. *Am J Vet Res*. 1981;42(5):743-7.
354. Jesaitis AJ, Buescher ES, Harrison D, Quinn MT, Parkos CA, Livesey S, et al. Ultrastructural localization of cytochrome b in the membranes of resting and phagocytosing human granulocytes. *J Clin Invest*. 1990;85(3):821-35.

355. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2012;12:557-69.
356. Joiner KA, Ganz T, Albert J, Rotrosen D. The opsonizing ligand on *Salmonella typhimurium* influences incorporation of specific, but not azurophil, granule constituents into neutrophil phagosomes. *J Cell Biol.* 1989;109(6 Pt 1):2771-82.
357. Joksimović-Todorović M., Davidović V.. Changes in white blood pictures and some biochemical parameters of dairy cows in peripartum period and early lactation. *Biochemical parameters of dairy cows.* 2012. *Mljekarstvo* 62, 2, 151-8.
358. Jones DH, Anderson DC, Burr BL, Rudloff HE, Smith CW, Krater SS, et al. Quantitation of intracellular Mac-1 (CD11b/CD18) pools in human neutrophils. *J Leukoc Biol.* 1988;44(6):535-44.
359. Jonjić S, Babić M, Polić B, Krmpotić A. Immune evasion of natural killer cells by viruses. *Curr Opin Immunol.* 2008;20(1):30-8.
360. Jonuleit H, Giesecke-Tuettenberg A, Tuting T, Thurner-Schuler B, Stuge TB, Paragnik L, et al. A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer.* 2001;93(2):243-51.
361. Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, et al. Proinflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol.* 1997;27(12):3135-42.
362. Juliarena M, Gutierrez S, Ceriani C. Determination of proviral load in bovine leukemia virus - infected cattle with and without lymphocytosis. *Am J Vet Res.* 2007;68(11):1220-5.
363. Kampen AH, Tollersrud T, Larsen S, et al. Repeatability of flow cytometric and classical measurement of phagocytosis and respiratory burst in bovine polymorphonuclear leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004;97(1-2):105-14.
364. Kang T, Yi J, Guo A, Wang X, Overall CM, Jiang W, et al. Subcellular distribution and cytokine- and chemokine-regulated secretion of leukolysin/MT6-MMP/MMP-25 in neutrophils. *J Biol Chem.* 2001;276(24):21960-8.
365. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol.* 2012;189(6):2689-95.
366. Katić V, Stojanović L. Broj somatskih ćelija u funkciji kvaliteta mleka. *Radovi sa XII Savetovanja agronoma, veterinara i tehnologa.* 1998;4(1):395-403.
367. Katić VR, Stojanović LV. Sagledavanje problema mastitisa u zavisnosti od proizvodnje mleka. *Vet glasnik.* 1996;50(5-6):317-22.
368. Kauf ACW, Rosenbusch RF, Paape MJ, et al. Innate immune response to intramammary *Mycoplasma bovis* infection. *J Dairy Sci.* 2007;90(7):3336-48.
369. Kawanishi N, Yano H, Yokogawa Y, Suzuki K. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exerc Immunol Rev.* 2010;16:105-18.

370. Kawasaki H, Koyama T, Conlon JM, Yamakura F, Iwamuro S. Antimicrobial action of histone H2B in *Escherichia coli*: evidence for membrane translocation and DNA-binding of a histone H2B fragment after proteolytic cleavage by outer membrane proteinase T. *Biochimie*. 2008;90(11-12):1693-702.
371. Keefe PG. *Streptococcus agalactiae* mastitis: A review. *Can Vet J*. 1997 Jul; 38(7): 429–437.
372. Kehrli ME, Nonnecke BJ, Roth JA. Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. *Am J Vet Res*. 1989;50(2):207-14.
373. Kennedy AD, Willment JA, Dorward DW, Williams DL, Brown GD, DeLeo FR. Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. *Eur J Immunol*. 2007;37(2):467-78.
374. Kent, G. M., Newbould F. H. S.. Phagocytosis and related phenomena in polymorphonuclear leukocytes from cow's milk. 1969. *Can. J. Comp. Med*. 33:214–219.
375. Keskin A, Seyrek-Intas K, Basri Tak H, Tuna B, Yilmazbas G, Ozakin C, et al. Efficiency of polyvalent mastitis vaccine in lactating dairy cows. *J Biol Environ Sci*. 2007;1(2):87-92.
376. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonermarck U, et al. (2009): Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med*. 2009;15(6):623-5.
377. Khwaja A, Carver JE, Linch DC. Interactions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF), granulocyte CSF, and tumor necrosis factor alpha in the priming of the neutrophil respiratory burst. *Blood*. 1992;79(3):745-53.
378. Kiefer F, Brumell J, Al-Alawi N, Latour S, Cheng A, Veillette A, et al. The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fc gamma receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol Cell Biol*. 1998;18(7):4209–20.
379. Kierszenbaum AL. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. 2nd ed. Philadelphia: Mosby; 2007.
380. Killmann SA, Cronkite EP, Fliedner TM, Bond VP. Mitotic indices of human bone marrow cells. I. Number and cytologic distribution of mitoses. *Blood*. 1962;19:743-50.
381. Kim PK, Zamora R, Petrosko P, Billiar TR. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *Int Immunopharmacol*. 2001;1(8):1421-41.
382. Kim IH, Na KJ, Yang MP. Immune responses during the peripartum period in dairy cows with postpartum endometritis. 2005. *J Reprod Dev*, 51, 6, 757-64.
383. Kim S, Shen T, Min B. Basophils can directly present or cross-present antigen to CD8 lymphocytes and alter CD8 T cell differentiation into IL-10-producing phenotypes. *J Immunol*. 2009;183(5):3033-9.
384. Kim S, Dinauer MC. Rac2 is an essential regulator of neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activation in response to specific signaling pathways. *J Immunol*. 2001;166(2):1223-32.
385. Kiple KF, Ornelas KC. *The Cambridge World History of Food*. Cambridge: Cambridge University Press; 2000.

386. Kirshenbaum AS, Goff JP, Kessler SW, et al. Effect of IL - 3 and stem - cell factor on the appearance of human basophils and mast cells from CD34+ pluripotent progenitor cells. *J Immunol.* 1992;148(3):772-7.
387. Kitamura Y, Kanakura Y, Sonoda S, Asai H, Nakano T. Mutual phenotypic changes between connective tissue type and mucosal mast cell. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1987;82(3-4):244-8.
388. Kjeldsen L, Bainton DF, Sengelov H, Borregaard N. Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: identification of a distinct gelatinase-containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation. *Blood.* 1993;82(10):3183-91.
389. Kjeldsen L, Bainton DF, Sengelov H, Borregaard N. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Blood.* 1994;83(3):799-807.
390. Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem.* 1993;268(14):10425-32.
391. Klastrup NO. Bovine mastitis. Definition and guidelines for diagnosis. *Kieler Milchw Forsch.* 1985;37(3):254-60.
392. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians.* 1999;111(5):383-9.
393. Kleczkowski M, Kluciński W, Shaktur A, Sikora J. Concentration of ascorbic acid in the blood of cows affected with mastitis. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2005;49:203-7.
394. Kleczkowski M, Kluciński W, Shaktur A, Sikora J. Concentration of ascorbic acid in the blood of cows with subclinical mastitis. *Pol J Vet Sci.* 2005;8(2):121-5.
395. Knight PA, Wright SH, Lawrence CE, Paterson YY, Miller HR. Delayed expulsion of the nematode *Trichinella spiralis* in mice lacking the mucosal mast cell specific granule chymase, mouse mast cell protease-1. *J Exp Med.* 2000;192(12):1849-56.
396. Kobayashi SD, DeLeo FR. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2009;1(3):309-33.
397. Kobiesy M. A. , El-Ali T. S. A.. Effect of ascorbic acid on growth performance and some blood constituents of suckling buffalo calves. 1994. *Assuit-Vet. Med. J.* 44:21-22.
398. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(3):159-75.
399. Kolb E. *Lehrbuch des physiologic der haustiere.* Jena: 347; 1962.
400. Kolb E. Metabolism of ascorbic acid in livestock under pathological conditions. In: Wegger I, Tagwerker FJ, Moustgaard J, editors. *Proceedings of the Workshop on Ascorbic Acid in Domestic Animals.* Copenhagen: The Royal Danish Agricultural Society; 1984. p. 162.
401. Kotz KT, Xiao W, Miller-Graziano C, Qian WJ, Russom A, Warner EA, et al. Clinical microfluidics for neutrophil genomics and proteomics. *Nat Med.* 2010;16(9):1042-7.
402. Kremer BT, Stahly TS, Ewan RC. Effects of dietary vitamin C on meat quality of pork. *J Anim Sci.* 1999;77(Suppl.1.):46.

403. Krishnaswamy G, Ajitawi O, Chi DS. The human mast cell, an overview. In: Krishnaswamy G, Chi DS, editors. *Mast cells methods and protocols*. Totowa: Humana Press; 2006: 13-34.
404. Krych-Goldberg M, Atkinson JP. Structure-function relationships of complement receptor type 1. *Immunol Rev*. 2001;180:112-22.
405. Kubach J, Becker C, Schmitt E, Steinbrink K, Huter E, Tuettenberg A, et al. Dendritic cells: Sentinels of immunity and tolerance. *Int J Hematol*. 2005;81(3):197-203.
406. Kucharski H, Zajac J. *Handbook of Vitamin C Research: Daily Requirements, Dietary Sources and Adverse Effects*. Nutrition and Diet Research Progress Series. New York: Nova Biomedical Books; 2009.
407. Kucmyj A. Vitamin C in cow's milk and colostrum and some questions of increasing its content. *Vopr Pitan*. 1955;14:3.
408. Kushwah R, Hu J. Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology*. 2011;133(4):409-19.
409. Ladmakhi MH, Buys N., Dewil E., Rahimi G., Decuypere E. The prophylactic effect of vitamin C supplementation on broiler ascites incidence and plasma thyroid hormone concentration. *Avian Pathology*. 1997; 26:33-44.
410. Lambeth D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(3):181-9.
411. Lamousé-Smith ES, Furuta GT. Eosinophils in the gastrointestinal tract. *Curr Gastroenterol Rep*. 2006; 8(5):390-5.
412. Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNApeptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med*. 2011;3(73):73ra19.
413. Landsman L, Varol C, Jung S. Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. *J Immunol*. 2007;178(4):2000-7.
414. Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:359-93.
415. Lapidot T, Kollet O. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia*. 2002;16(10):1992-2003.
416. Lapinet JA, Scapini P, Calzetti F, Perez O, Cassatella MA. Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin1beta (IL-1beta), IL-8, macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and gamma interferon-inducible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer membrane vesicles. *Infect Immun*. 2000;68(12):6917-23.
417. Larsson M, Fonteneau JF, Bhardwaj N. Dendritic cells resurrect antigens from dead cells. *Trends Immunol*. 2001;22(3):141-8.
418. Latimer KS. *Duncan and Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology*. 5th ed. Wiley-Blackwell; 2011.
419. Lattin J, Zidar DA, Schroder K, Kellie S, Hume DA, Sweet MJ. G-protein-coupled receptor expression, function, and signaling in macrophages. *J Leukoc Biol*. 2007;82(1):16-32.

420. Lauth X, von Kockritz-Blickwede M, McNamara CW, Myskowski S, Zinkernagel AS, Beall B, et al. M1 protein allows group A Streptococcal survival in phagocyte extracellular traps through cathelicidin inhibition. *J Innate Immun.* 2009;1(3):202-14.
421. Le Cabec V, Cowland JB, Calafat J, Borregaard N. Targeting of proteins to granule subsets is determined by timing and not by sorting: The specific granule protein NGAL is localized to azurophil granules when expressed in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(13):6454-7.
422. Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Conrad DH, et al. IL-3 promotes production of IL-4 by splenic non-B, non-T cells in response to Fc receptor cross-linkage. *J Immunol.* 1990;145(8):2500-6.
423. Lee J, O'Brien C, Guidry AJ, Paape MJ, Shafer-Weaver KA, Zhao X. Effect of a trivalent vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis lymphocyte subpopulations, antibody production, and neutrophil phagocytosis. *Can J Vet Res.* 2005;69(1):11-8.
424. Lee WL, Harrison RE, Grinstein S. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect.* 2003;5(14):1299-306.
425. Leeson S, Summers JD. *Scott's Nutrition of the Chicken.* 4th ed. Guelph: University Books; 2001.
426. Lefort CT, Rossaint J, Moser M, Petrich BG, Zarbock A, Monkley SJ, et al. Distinct roles for talin-1 and kindlin-3 in LFA-1 extension and affinity regulation. *Blood.* 2012;119(18):4275-82.
427. Lehrer RI, Ganz T, Szklarek D, Selsted ME. Modulation of the *in vitro* candidacidal activity of human neutrophil defensins by target cell metabolism and divalent cations. *J Clin Invest.* 1988;81(6):1829-35.
428. Lehtolainen T, Suominen S, Kutila T, et al. Effect of intramammary *Escherichia coli* endotoxin in early - vs. late - lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 2003;86(7):2327-33.
429. Leibovich SJ, Wiseman DM. Macrophages, wound repair and angiogenesis. *Prog Clin Biol Res.* 1988;266:131-45.
430. Leitner G, Krifucks O, Kiran M, Balaban N. Vaccine development for the prevention of staphylococcal mastitis in dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011;142(1-2):25-35.
431. Lemaire S, Trinh TT, Le HT, Tang SC, Hincke M, Wellman-Labadie O, et al. Antimicrobial effects of H4-(86-100), histogranin and related compounds-possible involvement of DNA gyrase. *FEBS J.* 2008;275(21):5286-97.
432. Ley K, Smith E, Stark MA. IL-17A- producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. *Immunol Res.* 2006;34(3):229-42.
433. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(9):678-89.
434. Lewin, S. *Vitamin C: Its molecular biology and medical potential.* 1975. Academic Press, London. pp. 81-85.
435. Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med.* 2010;207(9):1853-62.

436. Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, et al. William's hematology. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 2006.
437. Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G, Metcalf D, Stanley E, Cheers C, et al. Mice lack in granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood*. 1994;84(6):1737-46.
438. Lin Y, Xia L, Turner JD, Zhao X. Morphologic observation of neutrophil diapedesis across bovine mammary gland epithelium *in vitro*. *Am J Vet Res*. 1995;56(2):203-7.
439. Lindmark A, Garwicz D, Rasmussen PB, Flodgaard H, Gullberg U. Characterization of the biosynthesis, processing, and sorting of human HBP/CAP37/azurocidin. *J Leukoc Biol*. 1999;66(4):634-43.
440. Liu GY, Essex A, Buchanan JT, Datta V, Hoffman HM, Bastian JF, et al. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J Exp Med*. 2005;202(2):209-15.
441. Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev*. 2010;234(1):45-54.
442. Liu K, Victora GD, Schwickert TA, et al. *In vivo* analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science*. 2009;324(5925):392-7
443. Liu L, Ganz T. The pro region of human neutrophil defensin contains a motif that is essential for normal subcellular sorting. *Blood*. 1995;85(4):1095-103.
444. Loeffler DA, Norcross NL. Use of enzyme-linked immunosorbent assay to measure bovine milk and serum antibodies to alpha toxin, beta toxin, and capsular antigens of *Staphylococcus aureus*. *Vet Immunol Immunopathol*. 1987;14(2):145-56.
445. Logters T., Margraf S., Altrichter J., Cinatl J., Mitzner S., Windolf J. et al. The clinical value of neutrophil extracellular traps. 2009. *Med. Microbiol. Immunol*. 198 211–219
446. Lollike K, Kjeldsen L, Sengelov H, Borregaard N. Lysozyme in human neutrophils and plasma. A parameter of myelopoietic activity. *Leukemia*. 1995;9(1):159-64.
447. Lominadze G, Powell DW, Luerman GC, Link AJ, Ward RA, McLeish KR. Proteomic analysis of human neutrophil granules. *Mol Cell Proteomics*. 2005;4(10):1503-21.
448. Longworth KE. The comparative biology of pulmonary intravascular macrophages. *Front Biosci*. 1997;2:d232-41.
449. Lord BI. The kinetics of human granulopoiesis following treatment with granulocyte colony-stimulating factor *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(23):9499-503.
450. Lotze MT, Zeh HJ, Rubartelli A, Sparvero LJ, Amoscato AA, Washburn NR, et al. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol Rev*. 2007;220:60-81.
451. Lumsden JH, Valli VEO, McSherry BJ, et al. The Piromen test as an assay of bone marrow granulocyte reserves in the calf: Studies on bone marrow and peripheral blood leukocytes. *Can J Comp Med*. 1974;38(1):56-64.
452. Lykkesfeldt J, Svendsen O. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet J*. 2007;173(3):502-11.
453. MacGlashan D. Biochemical events in basophil/mast cell activation and mediator release. In: Adkinson N, Bochner BS, Busse WW, Holgate ST, Lemanske RF, Simons

- FER, editors. Middleton's allergy: principles and practice. 7th ed. St. Louis: Mosby, Elsevier; 2009.
454. Mackenzie AM, Drennan M, Rowan TG, Dixon JB, Carter SD. Effect of transportation and weaning on humoral immune responses of calves. *Res Vet Sci.* 1997;63(3):227-30.
455. MacLeod DD, Ozimek L, Kennelly JJ. Supplemental vitamin C may enhance immune function in dairy cows. *Adv Dairy Technol.* 1996;8:227-35.
456. MacLeod DD, Zhang X, Ozimek L, Kennelly JJ. Ascorbyl-2-polyphosphate as a source of ascorbic acid for dairy cattle. *Milchwissenschaft.* 1999;54(3):123-6.
457. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:323-50.
458. MacPherson A. Plasma ascorbic acid in sheep as affected by cobalt status. *Proceedings of the Workshop on Ascorbic Acid in Domestic Animals.* Skjoldenaesholm, Denmark: Scandinavian Association of Agricultural Scientists and the Royal Danish Agricultural Society; 1983. p. 148-51.
459. MacPherson JC, Comhair SA, Erzurum SC, Klein DF, Lipscomb MF, Kavuru MS, et al. Eosinophils are a major source of nitric oxide-derived oxidants in severe asthma: characterization of pathways available to eosinophils for generating reactive nitrogen species. *J Immunol.* 2001;166(9):5763-72.
460. Magaš VB. Priprema, ispitivanje imunogenosti i ocena efikasnosti vakcine u profilaksi nastanka mastitisa kod krava [doktorska disertacija]. Beograd (Srbija): Univerzitet u Beogradu - Fakultet veterinarske medicine; 2012.
461. Magro AM, Rudofsky UH, Schrader WP, et al. Characterization of IgE mediated histamine - release from equine basophils *in vitro*. *Equine Vet J.* 1988;20(5):352-6.
462. Majić B. Veterinarski pristup suzbijanju osobito supkliničkih mastitisa. *Prax Vet.* 1995;43:199-211.
463. Malm J, Sorensen O, Persson T, Frohm-Nilsson M, Johansson B, Bjartell A, et al. The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa. *Infect Immun.* 2000;68(7):4297-302.
464. Manlongat N, Yang TJ, Hinckley LS, Bendel RB, Krider HM. Physiologic chemoattractant-induced migration of polymorphonuclear leukocytes in milk. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998;5(3):375-81.
465. Mansour MK, Levitz SM. Interactions of fungi with phagocytes. *Curr Opin Microbiol.* 2002;5(4):359-65.
466. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, et al. Macrophage polarization: tumor - associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002;23(11):549-55.
467. Manz MG, Miyamoto T, Akashi K, Weissman IL. Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(18):11872-7
468. Marketon MM, DePaolo RW, DeBord KL, Jabri B, Schneewind O. Plague bacteria target immune cells during infection. *Science.* 2005;309(5741):1739-41.

469. Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol.* 2005;15(11):599-607.
470. Martchenko M., Alarco A. M., Harcus D., Whiteway M. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. 2004.*Mol. Biol. Cell* 15:456–467.
471. Massena S, Christoffersson G, Hjertröm E, Zcharia E, Vlodaysky I, Ausmees N, et al. A chemotactic gradient sequestered on endothelial heparan sulfate induces directional intraluminal crawling of neutrophils. *Blood.* 2010;116(11):1924-31.
472. Massol P, Montcourrier P, Guillemot JC, Chavrier P. Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1. *EMBO J.* 1998;17(21):6219-29.
473. Mathias JR, Perrin BJ, Liu TX, Kanki J, Look AT, Huttenlocher A. Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish. *J Leukoc Biol.* 2006;80(6):1281-8.
474. Mateus L., Lopes da Costa L., Carvalho H., Serra P., Silva R.. Blood and intrauterine leukocyte profile and function in dairy cows that spontaneously recovered from postpartum endometritis. 2002.*Reprod Domest Anim*, 37, 176-80.
475. Matthews AN, Friend DS, Zimmermann N, et al. : Eotaxin is required for the baseline level of tissue eosinophils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(11):6273-8.
476. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:991-1045.
477. Mazzoni, A., Siraganian R.P., Leifer C. A. , Segal D. M., Dendritic Cell Modulation by Mast Cells Controls the Th1/Th2 Balance in Responding T Cells. *J. Immunol.*2006.177: 3577–3581.
478. Maxie GM. *Pathology of Domestic Animals.* 5th ed. New York: Elsevier Saunders; 2007.
479. McDermott JR, Bartram RE, Knight PA, Miller HR, Garrod DR, Grensis RK. Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric nematode infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(13):7761-6.
480. McDonald B, McAvoy EF, Lam F, Gill V, de la Motte C, Savani RC, et al. Interaction of CD44 and hyaluronan is the dominant mechanism for neutrophil sequestration in inflamed liver sinusoids. *J Exp Med.* 2008;205(4):915-27.
481. McDonald JS, Anderson AJ. Total and differential somatic cell counts in secretions from noninfected bovine mammary glands; the peripartum period. *Am J Vet Res.* 1981;42(8):1366-8.
482. McDowell LR. *Vitamins in Animal and Human Nutrition.* Ames, IA: Iowa State University Press; 2000.
483. McEwen BJ. Eosinophils: a review. *Vet Res Commun.* 1992;16(1):11-44.
484. McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:487-513.
485. McKee JS, Harrison PC. Effects of supplemental ascorbic acid on the performance of broiler chickens exposed to multiple concurrent stressors. *Poult Sci.* 1995;74(11):1772-85.

486. Medina E. Neutrophil extracellular traps: a strategic tactic to defeat pathogens with potential consequences for the host. *J Innate Immun.* 2009;1(3):176-80.
487. Medina E, Rohde M, Chhatwal GS. Intracellular survival of *Streptococcus pyogenes* in polymorphonuclear cells results in increased bacterial virulence. *Infect Immun.* 2003;71(9):5376-80.
488. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immunity. *N Engl J Med.* 2000;343(5):338-44.
489. Megens RT, Kemmerich K, Pyta J, Weber C, Soehnlein O. Intravital imaging of phagocyte recruitment. *Thromb Haemost.* 2011;105(5):802-10.
490. Mehrzad J, Dosogne H, Meyer E, Heyneman R, Burvenich C. Respiratory burst activity of blood and milk neutrophils in dairy cows during different stages of lactation. *J Dairy Res.* 2001;68(3):399-415.
491. Mehrzad J, Dosogne H, Meyer E, Hoeben D, Burvenich C. Effect of alactalbumin and β -lactoglobulin on the superoxide production of bovine milk neutrophils. *Biotechnol Agron Soc Environ.* 2000;4:22.
492. Mehrzad J, Duchateau L, Pyorala S, Burvenich C. Blood and milk neutrophil chemiluminescence and viability in primiparous and pluriparous dairy cows during late pregnancy, around parturition and early lactation. *J Dairy Sci.* 2002;85(12):3268-76.
493. Mehrzad J, Duchateau L, Burvenich C. Viability of milk neutrophils and severity of bovine coliform mastitis. *J Dairy Sci.* 2004;87(12):4150-62.
494. Mehrzad J, Duchateau L, Burvenich C. High milk neutrophil chemiluminescence limits the severity of bovine coliform mastitis. *Vet Res.* 2005;36(1):101-16.
495. Mehrzad J, Janssen D, Duchateau L, Burvenich C. Increase in *Escherichia coli* inoculum dose accelerates CD8 + T-cell trafficking in the primiparous bovine mammary gland. *J Dairy Sci.* 2008;91(1):193-201.
496. Mehrzad J, Duchateau L, Burvenich C. Phagocytic and bactericidal activity of blood and milk-resident neutrophils against *Staphylococcus aureus* in primiparous and multiparous cows during early lactation. *Vet Microbiol.* 2009;134(1-2):106-12.
497. Mekori YA, Metcalfe DD. Mast cell-T cell interaction. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104(3 Pt 1):517-23.
498. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: Specialized and regulated antigen processing machines. *Cell.* 2001;106(3):255-8.
499. Melo RC, Spencer LA, Dvorak AM, et al. Mechanisms of eosinophil secretion: large vesiculotubular carriers mediate transport and release of granule - derived cytokines and other proteins. *J Leukoc Biol.* 2008;83(2):229-36.
500. Menestrina G, Serra MD, Prevost G. Mode of action of beta-barrel pore-forming toxins of the staphylococcal alpha-hemolysin family. *Toxicon.* 2001;39(11):1661-72.
501. Merluzzi S, Frossi B, Gri G, Parusso S, Tripodo C, Pucillo C. Mast cells enhance proliferation of B lymphocytes and drive their differentiation towards IgA-secreting plasma cells. *Blood.* 2010;115(14):2810-7.
502. Mesquita D, Jr, Cruvinel WM, Câmara NOS, Kállas EG, Andrade LEC. Autoimmune diseases in the TH17 era. *Braz J Med Biol Res.* 2009;42(6):476-86.
503. Metcalfe DD. Mast cells and mastocytosis. *Blood.* 2008;112(4):946-56.

504. Metz M, Brockow K, Metcalfe DD, Galli SJ. Mast cells, basophils, and mastocytosis. In: Rich R, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder HW, Frew AJ, Weyand CM, editors. Clinical immunology: principles and practice. 3rd ed. St. Louis: Mosby, Elsevier; 2008.
505. Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood*. 2011;117(3):953-9.
506. Michaelson D, Rayner J, Couto M, Ganz T. Cationic defensins arise from charge-neutralized propeptides: a mechanism for avoiding leukocyte autotoxicity? *J Leukoc Biol*. 1992;51(6):634-9.
507. Middleton JR, Luby CD, Adams S. Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: A review and new data. *Vet Microbiol*. 2009;134(1-2):192-8.
508. Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, et al. Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2⁺ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci*. 2007;10(12):1544-53.
509. Milićević E, Milanović M, Milenović M, Milenković M, Radenković M. Lekovi koji se koriste u terapiji mastitisa; 2010 [cited 2015 Nov 9]. Available from: <http://supa.pharmacy.bg.ac.rs/assets/17956>.
510. Miljković V. Higijena i tehnologija mleka. Beograd: Naučna knjiga; 1977.
511. Miller ER, Kornegay ET. Mineral and vitamin nutrition of swine. *J Anim Sci*. 1983;57 Suppl 2:315-29.
512. Miller JK, Brezezinska-Slebodzinska E. Oxidative stress, antioxidants and animal function. *J Dairy Sci*. 1993;76(9):2812-23.
513. Milovanović AM. Ispitivanje uticaja funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita i progesteronskog profila na razvoj poremećaja u reprodukciji krava [doktorska disertacija]. Beograd (Srbija): Univerzitet u Beogradu - Fakultet veterinarske medicine; 2014.
514. Min B, Brown MA, Legros G. Understanding the roles of basophils: breaking dawn. *Immunology*. 2012;135(3):192-7.
515. Min B, Prout M, Hu-Li J, et al. Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. *J Exp Med*. 2004;200(4):507-17.
516. Mirinics ZK, Calafat J, Udby L, Lovelock J, Kjeldsen L, Rothermund K, et al. Identification of the presenilins in hematopoietic cells with localization of presenilin 1 to neutrophil and platelet granules. *Blood Cells Mol Dis*. 2002;28(1):28-38.
517. Mishra A, Mishra A, Hogan SP, et al. Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract. *J Clin Invest*. 1999;103(12):1719-27.
518. Mitchell GB, Albright BN, Caswell JL. Effect of interleukin-8 and granulocyte colony-stimulating factor on priming and activation of bovine neutrophils. *Infect Immun*. 2003;71(4):1643-9.
519. Mitchell J, Russo BA. Thiols, thiol depletion, and thermosensitivity. *Radiat Res*. 1983;95(3):471-85.
520. Miyoshi-Akiyama T, Takamatsu D, Koyanagi M, Zhao J, Imanishi K, Uchiyama T. Cytocidal effect of *Streptococcus pyogenes* on mouse neutrophils *in vivo* and the critical role of streptolysin S. *J Infect Dis*. 2005;192(1):107-16.

521. Mohamed HE, Mousa HM, Beynen AC. Vitamin C status of Sudanese cattle and sheep. *J Biol Sci.* 2004;4(6):778-9.
522. Mohri M, Sharifi K, Eidi S. Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: age related changes and comparison with blood composition in adults. *Res Vet Sci.* 2007;83(1):30-9.
523. Mollinedo F, Calafat J, Janssen H, et al. Combinatorial SNARE complexes modulate the secretion of cytoplasmic granules in human neutrophils. *J Immunol.* 2006;177(5):2831-41.
524. Mollinedo F, Nakajima M, Llorens A, Barbosa E, Callejo S, Gajate C, et al. Major co-localization of the extracellular-matrix degradative enzymes heparanase and gelatinase in tertiary granules of human neutrophils. *Biochem J.* 1997;327(Pt 3):917-23.
525. Mollnes TE, Brekke OL, Fung M, Fure H, Christiansen D, Bergseth G, et al. Essential role of the C5a receptor in *E. coli*-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. *Blood.* 2002;100(5):1869-77.
526. Moore PF, Affolter VK, Vernau W. Canine hemophagocytic histiocytosis sarcoma: a proliferative disorder of CD11d+ macrophage. *Vet Pathol.* 2006;43(5):632-45.
527. Moretta A, Biassoni R, Bottino C, et al. Major histocompatibility complex class I-specific receptors on human natural killer and T lymphocytes. *Immunol Rev.* 1997;155:105-17.
528. Morris P, Shaman J, Attaya M, Amaya M, Goodman S, Bergman C, et al. An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. *Nature.* 1994;368(6471):551-4.
529. Moss PA, Rosenberg WM, Bell JL. The human T cell receptor in health and disease. *Annu Rev Immunol.* 1992;10:71-96.
530. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(12):958-69.
531. Mosser DM, Handman E. Treatment of murine macrophages with interferon-gamma inhibits their ability to bind leishmania promastigotes. *J Leukoc Biol.* 1992;52(4):369-76.
532. Mourot J, Aumaitre A, Wallet P. Effect of a dietary supplement of vitamin C on growth and pig meat quality. In: Wenk C, Fenster R, Völker L, editors. *Proceedings of the Symposium on Ascorbic acid in Domestic Animals.* 1990 Oct 9-12; Kartause Ittingen, Switzerland. Zurich: Swiss Federal Institute of Technology; 1990. p. 176-185.
533. Moya S. L., Gomez M. A., Boyle L. A., Mee J. F., O'Brien B., Arkins S.. Effects of milking frequency on phagocytosis and oxidative burst activity of phagocytes from primiparous and multiparous dairy cows during early lactation. 2008. *J. Dairy Sci.* 91:587–595.
534. Munafò DB, Johnson JL, Brzezinska AA, Ellis BA, Wood MR, Catz SD. DNase i inhibits a late phase of reactive oxygen species production in neutrophils. *J Innate Immun.* 2009;1(6):527-42.

535. Murphy G, Reynolds JJ, Bretz U, Baggiolini M. Collagenase is a component of the specific granules of human neutrophil leucocytes. *Biochem J.* 1977;162(1):195-7.
536. Murphy KM, Travers P, Walport M. *Janeway's immunobiology.* 7th ed. New York and London: Garland Science; 2007.
537. Murray PJ, Wynn TA. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol.* 2011;89(4):557-63.
538. Musal B, Ulutas PA, Turkyilmaz S. Blood vitamin C, vitamin A, beta-carotene, ceruloplasmin, glutathione and malondialdehyde concentrations in cows with subclinical mastitis treated with intramammary antibiotics. *Rev Med Vet.* 2007;158(12):633-40.
539. Mylonas KJ, Nair MG, Prieto-Lafuente L, Paape D, Allen JE. Alternatively activated macrophages elicited by helminth infection can be reprogrammed to enable microbial killing. *J Immunol.* 2009;182(5):3084-94.
540. Myones BL, Dalzell JG, Hogg N, Ross GD. Neutrophil and monocyte cell surface p150, 95 has iC3b-receptor (CR4) activity resembling CR3. *J Clin Invest.* 1988;82(2):640-51.
541. Naessens J, Hobkins J. Third workshop on ruminant leukocyte antigens. *Vet Immunol Immunopathol.* 1996;52(4):213-468.
542. Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K, et al. Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol.* 2003;171(8):3977-82.
543. Nagórna-Stasiak B, Lechowski J, Kowalczyk M. The effect of vitamin E on ascorbic acid synthesis in chicken. *Med Weter.* 1997;53(4):224-6.
544. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med.* 2007;204(12):3037-47.
545. Naidu TG, Newbould FH. Glycogen in leukocytes from bovine blood and milk, 1973. *Can J Comp, MedVet Sci,* 37, 47-55.
546. Naik SH, Metcalf D, van Nieuwenhuijze A, Wicks I, Wu L, O'Keeffe M, et al. Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol.* 2006;7(6):663-71.
547. Nanda A, Brumell JH, Nordstrom T, Kjeldsen L, Sengelov H, Borregaard N, et al. Activation of proton pumping in human neutrophils occurs by exocytosis of vesicles bearing vacuolar-type H⁺-ATPases. *J Biol Chem.* 1996;271(27):15963-70.
548. Naresh R, Dwivedi SK, Swarup D, Patra RC. Evaluation of ascorbic acid treatment in clinical and subclinical mastitis of Indian dairy cows. *Asian-Aust J Anim Sci.* 2002;15(6):905-11.
549. Naresh R, Dwivedi SK, Swarup D, Patra RC. Effect of ascorbic acid on milk lead and cadmium level on subclinical and clinical cases of mastitis. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2003;71(5):899-904.
550. Nathan C. Mechanisms and modulation of macrophage activation. *Behring Institute Mitteilungen.* 1991; Feb: 200-207.
551. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(3):173-82.

552. Nauseef WM. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochem Cell Biol.* 2004;122(4):277-91.
553. Nauseef WM, McCormick S, Yi H. Roles of heme insertion and the mannose-6-phosphate receptor in processing of the human myeloid lysosomal enzyme, myeloperoxidase. *Blood.* 1992;80(10):2622-33.
554. Nauseef WM, Volpp BD, McCormick S, Leidal KG, Clark RA. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components. *J Biol Chem.* 1991;266(9):5911-7.
555. Ndiweni N, Field TR, Williams MR, Booth JM, Finch JM. Studies on the incidence of clinical mastitis and blood levels of vitamin E and selenium in dairy herds in England. *Vet Rec.* 1991;129(5):86-8.
556. Neeli I, Khan SN, Radic M. Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *J Immunol.* 2008;180(3):1895-902.
557. Newbould FH. Enhancement of phagocytosis in bovine milk leukocytes in vitro. 1970. *Can J Comp Med Vet Sci*, 34, 261-4.
558. Newbould FH. The effect of added serum and glucose, and some inherent factors, on phagocytosis in vitro by milk leukocytes from several cows. *Can J Comp Med.* 1973;37(2):189-94.
559. Nickerson SC. Immune mechanisms of the bovine udder - an overview. *J Am Vet Med Assoc.* 1985;187(1):41-5.
560. Nickerson SC, Nickerson WE, Owens GM, Tomita PW. Vaccinating dairy heifers with a *Staphylococcus aureus* bacterin reduces mastitis at calving. *Large Anim Pract.* 1999;20:16-28.
561. Nijkamp FP, Parnham MJ. Principles of immunopharmacology. 3rd revised and extended ed. AG: Springer Basel; 2011.
562. Nikolić J. Biohemija za studente Poljoprivrednog fakulteta. Republika Srpska: Poljoprivredni fakultet - Banja Luka; 2007.
563. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity.* 2006;24(1):19-28.
564. Nockels CF. The role of vitamin in modulating disease resistance. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1988;4(3):531-42.
565. Nordenfelt P. Phagocytosis by neutrophils - studies on phagosome dynamics and membrane traffic modulation by *Streptococcus pyogenes* [dissertation]. Lund University; 2010.
566. Nordenfelt P, Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2011;90(2):271-84.
567. Nordhaug ML, Nesse LL, Norcross NL, Gudding R. A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 1. Clinical parameters. *J Dairy Sci.* 1994;77(5):1267-75.

568. Nordhaug ML, Nesse LL, Norcross NL, Gudding R. A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 2. Antibody response. J Dairy Sci. 1994a;77(5):1276-84.
569. Noss EH, Pai RK, Sellati TJ, et al. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol. 2001;167(2):910-8.
570. NRC. Vitamin tolerance of animals. Washington, DC: National Academy of Sciences - National Research Council; 1987.
571. NRC. Nutrient requirements of swine. 10th ed. Washington, DC: National Academy Press; 1998.
572. NRC. Nutrient requirements of domestic animals: nutrient requirements of dairy cattle. 7th review ed. Washington, DC: National Academy of Sciences - National Research Council; 2001.
573. Nutrient Data Laboratory. USDA National nutrient database for standard reference. release 23. USA: United States Department of Agriculture Research Service; 2010.
574. Ohnmacht C, Voehringer D. Basophil effector function and homeostasis during helminth infection. Blood. 2009;113(12):2816-25.
575. Omer OH, El - Malik KH, Mahmoud OM, et al. Haematological profiles in pure bred cattle naturally infected with *Theileria annulata* in Saudi Arabia. Vet Parasitol. 2002;107(1-2):161-8.
576. Ono SJ, Nakamura T, Miyazaki D, et al. Chemokines: role in leukocyte development, trafficking, and effector function. J Allergy Clin Immunol. 2003;111(6):1185-99.
577. Ooi CE, Weiss J, Elsbach P, Frangione B, Mannion B. A 25-kDa NH-terminal fragment carries all the antibacterial activities of the human neutrophil 60-kDa bactericidal/permeability-increasing protein. J Biol Chem. 1987;262(31):14891-4.
578. Opdebeeck JP, Norcross NL. Antibodies in bovine serum and rectal secretions to capsular antigens of *Staphylococcus aureus*. Am J Vet Res. 1985;46(7):1561-4.
579. Oram JD, Reiter B. Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents. Biochim Biophys Acta. 1968;170(2):351-65.
580. Ostrovsky L, King AJ, Bond S, Mitchell D, Lorant DE, Zimmerman GA, et al. A juxtacrine mechanism for neutrophil adhesion on platelets involves platelet-activating factor and a selectin-dependent activation process. Blood. 1998;91(8):3028-36.
581. Owen CA, Campbell EJ. The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. J Leukoc Biol. 1999;65(2):137-50.
582. Paape MJ, Bannerman DD, Zhao X, et al. The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk. Vet Res. 2003;34(5):597-627.
583. Paape M. J., Guidry A. J., Kirk S. T., Bolt D. J.. Measurement of phagocytosis of 32P-labeled *Staphylococcus aureus* by bovine leukocytes: Lysostaphin digestion and inhibitory effect of cream. 1975. Am. J. Vet. Res. 36:1737.
584. Paape MJ, Guidry AJ. Effect of fat and casein on intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by milk leukocytes. Proc Soc Exp Biol Med. 1977;155(4):588-93.

585. Paape MJ, Mehrzad J, Zhao X, Detileux J, Burvenich C. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2002;7(2):109-21.
586. Paape MJ, Miller RH, Ziv G. Effects of florfenicol, chloramphenicol, and thiamphenicol on phagocytosis, chemiluminescence, and morphology of bovine polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J Dairy Sci*. 1990;73(7):1734-44.
587. Paape MJ, Wergin WP, Guidry AJ, Pearson RE. Leukocytes-second line of defense against invading mastitis pathogens. *J Dairy Sci*. 1979;62(1):135-53.
588. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, et al. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr*. 2003;22(1):18-35.
589. Padh H. Vitamin C: newer insights into its biochemical functions. *Nutr Rev*. 1991;49(3):65-70.
590. Padilla L, Matsui T, Kamiya Y, Kamiya M, Tanaka M, Yano H. Heat stress decreases plasma vitamin C concentration in lactating cows. *Livest Sci*. 2006;101(1-3):300-4.
591. Padilla L., Matsui T., Ikeda S., Kitagawa M., Yano H.. The effect of vitamin C supplementation on plasma concentration and urinary excretion of vitamin C in cattle. 2007.*J Anim Sci*. 85:3367–3370.
592. Padilla L, Shibano K, Inoue J, Matsui T, Yano H. Plasma vitamin C concentration is not related to the incidence of ketosis in dairy cows during the early lactation period. *J Vet Med Sci*. 2005;67(9):883-6.
593. Palic D, Ostojic J, Andreasen CB, Roth JA. Fish cast NETs: neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. *Dev Comp Immunol*. 2007;31(8):805-16.
594. Palludan B, Wegger I. Plasma ascorbic acid in calves-relations to age and individuality. In: Wegger I, Tagwerker FJ, Moustgaard J, editors. *Proceedings of the Workshop on Ascorbic Acid in Domestic Animals*. Copenhagen: The Royal Danish Agricultural Society; 1984. p. 131.
595. Palmer LJ, Cooper PR, Ling MR, Wright HJ, Huissoon A, Chapple ILC. Hypochlorous acid regulates neutrophil extracellular trap release in humans. *Clin Exp Immunol*. 2012;167(2):261-8.
596. Palucka K, Banchereau J. Linking innate and adaptive immunity. *Nat Med*. 1999;5(8):868-70.
597. Pamer E, Cresswell P. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:323-58.
598. Pankey JW. Hygiene of milking time in the prevention of bovine mastitis. *Br Vet J*. 1989;145(5):401-9.
599. Pankey JW, Eberhart RJ, Cuming AL, Daggett RD, Farnsworth RJ, McDuff CK. Uptake of postmilking teat antiseptics. *J Dairy Sci*. 1984;67(6):1336-53.
600. Paolini R, Jouvin MH, Kinet JP. Phosphorylation and dephosphorylation of the high-affinity receptor for immunoglobulin E immediately after receptor engagement and disengagement. *Nature*. 1991;353(6347):855-8.

601. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2010;191(3):677-91.
602. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet.* 2001;357(9270):1777-89.
603. Parravicini V, Gadina M, Kovarova M, et al. Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nat Immunol.* 2002;3(8):741-8.
604. Parsons SA, Sharma R, Roccamatysi DL, Zhang H, Petri B, Kubes P, et al. Endothelial paxillin and focal adhesion kinase (FAK) play a critical role in neutrophil transmigration. *Eur J Immunol.* 2012;42(2):436-46.
605. Patel AH, Nowlan P, Weavers ED, Foster T. Virulence of protein A-deficient and alpha-toxin-deficient mutants of *Staphylococcus aureus* isolated by allele replacement. *Infect Immun.* 1987;55(12):3103-10.
606. Paul W. *Fundamental immunology*. 7th ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
607. Pavlović V, Pavlović M, Vakanjac S. Preventiva i terapija mastitisa krava. Zbornik radova Simpozijuma Mastitis i kvalitet mleka; 2001 Maj 30-Jun 02; Vrnjačka Banja, Srbija; 2001.
608. Pavlović V, Vakanjac S, Pavlović M. Terapija krava u zasušenju. *Vet glasnik.* 1996;50:351-5.
609. Pecaric-Petkovic T, Didichenko SA, Kaempfer S, Spiegl N, Dahinden CA. Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood.* 2009;113(7):1526-34.
610. Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, Costantini C, et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood.* 2010;115(2):335-43.
611. Perkins PC, Grindem CB, Carter PB. Flow cytometry: the next step in diagnostic testing. *Comp Cont Educ Pract.* 1996;18(4):421-6.
612. Petri B, Kaur J, Long EM, Li H, Parsons SA, Butz S, et al. Endothelial LSP1 is involved in endothelial dome formation, minimizing vascular permeability changes during neutrophil transmigration *in vivo*. *Blood.* 2011;117(3):942-52.
613. Petri B, Phillipson M, Kubes P. The physiology of leukocyte recruitment: an *in vivo* perspective. *J Immunol.* 2008;180(10):6439-46.
614. Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med.* 2006;203(12):2569-75.
615. Phillipson M, Kaur J, Colarusso P, Ballantyne CM, Kubes P. Endothelial domes encapsulate adherent neutrophils and minimize increases in vascular permeability in paracellular and transcellular emigration. *PLoS ONE.* 2008;3(2):e1649.
616. Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med.* 2011;17(11):1381-90.
617. Pillai SR, Kunze E, Sordillo LM, Jayarao BM. Application of differential inflammatory cell count as a tool to monitor udder health. *J Dairy Sci.* 2001;84(6):1413-20.

618. Pillay J, Den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, De Boer RJ, Borghans JA, et al. *In vivo* labeling with $2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*. 2010;116(4):625-7.
619. Piller K, Portmann P. Isolation and characterization of four basic proteins from horse eosinophilic granules. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;192(2):373-80.
620. Pilszczek FH, Salina D, Poon KK, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*. 2010;185(12):7413-25.
621. Pinchuk LM, Boyd BL, Kruger EF, Roditi I, Furger A. Bovine dendritic cells generated from monocytes and bone marrow progenitors regulate immunoglobulin production in peripheral blood B cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2003;26(4):233-49.
622. Pion SJ, van Heugten E, See MT, Larick DK, Pardue S. Effects of vitamin C supplementation on plasma ascorbic acid and oxalate concentrations and meat quality in swine. *J Anim Sci*. 2004;82(7):2004-12.
623. Pizarro-Cerda J, Cossart P. Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*. *J Pathol*. 2006;208(2):215-23.
624. Plager DA, Loegering DA, Checkel JL, Tang J, Kephart GM, Caffes PL, et al. Major basic protein homolog (MBP2): a specific human eosinophil marker. *J Immunol*. 2006;177(10):7340-5.
625. Politis I, Hidioglou M, Batra RT, Gilmore JA, Gorewit RC, Sherf H. Effects of vitamin E on immune function of dairy cows. *Am J Vet Res*. 1995;56(2):179-84.
626. Popken-Harris P, Checkel J, Loegering D, Madden B, Springett M, Kephart G, et al. Regulation and processing of a precursor form of eosinophil granule major basic protein (ProMBP) in differentiating eosinophils. *Blood*. 1998;92(2):623-31.
627. Power HT, Rebhun WS. Bacterial endocarditis in adult dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc*. 1983;182(8):806-8.
628. Pribyl E. Diseases of young cattle. Praha: SZN; 1963.
629. Pruenster M, Mudde L, Bombosi P, Dimitrova S, Zsak M, Middleton J, et al. The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity. *Nat Immunol*. 2009;10(1):101-8.
630. Pyorala S. Antimicrobial treatment of mastitis-choice of the route of administration and efficacy. In: Proceedings of the British Mastitis Conference. Institute for Animal Health/Milk Development Council: Brockworth; 2002. p. 20-29.
631. Quinn PJ. Veterinary microbiology and microbial disease. Cornwall, UK: Blackwell Science Ltd and MPG books Ltd; 2002.
632. Raab W. Skin cleansing in health and disease. *Wien Med Wochenschr Suppl*. 1990;108:4-10.
633. Rada BK, Geiszt M, Kaldi K, Timar C, Ligeti E. Dual role of phagocytic NADPH oxidase in bacterial killing. *Blood*. 2004;104(9):2947-53.
634. Radostits O, Blood DC, Gay CC. Veterinary medicine. 8th ed. London-Philadelphia-Sydney-Tokio-Toronto: Baillere Tindal; 1994.
635. Radovanović A, Stevanović J, Gledić D. Apoptoza kao način prirodnog odumiranja ćelija jajnika. *Vet glasnik*. 2004;58:43-54.

636. Rainard P, Poutrel B. Dynamics of nonclinical bovine intramammary infections with major and minor pathogens. *Am J Vet Res.* 1982;43(12):2143-6.
637. Rainard P, Riollet C, Poutrel B, Paape MJ. Phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* by bovine neutrophils after priming by tumor necrosis factor-alpha and the des-arginine derivative of C5a. *Am J Vet Res.* 2000;61(8):951-9.
638. Ramachandran V, Williams M, Yago T, Schmidtke DW, McEver RP. Dynamic alterations of membrane tethers stabilize leukocyte rolling on P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(37):13519-24.
639. Ramaiah SK, Jaeschke H. Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury. *Toxicol Pathol, Vol. 35, 757-766.* 2007 Oct;35(6):757-66.
640. Ramanathan K, Balakumar S, Panneerselvam C. Effects of ascorbic acid and alpha-tocopherol on arsenic-induced oxidative stress. *Hum Exp Toxicol.* 2002;21(12):675-80.
641. Ramos CL, Pou S, Britigan BE, Cohen MS, Rosen GM. Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes. *J Biol Chem.* 1992;267(12):8307-12.
642. Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(8):617-28.
643. Ranjan R, Swarup D, Naresh R, Patra RC. Ameliorative potential of L-ascorbic acid in bovine clinical mastitis. *Indian J Anim Scis.* 2005;75(2):174-7.
644. Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabella G, et al. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature.* 2002;416(6878):291-7.
645. Reichmuth J. Somatic cell counting - interpretation of results. Document 85. In: *Proceedings of the Seminar on Mastitis Control.* 1975 Apr 7-11; Brussels: International Dairy Federation; 1975. p. 93-109.
646. Reineke EP, Garrison ER, Turner CW. The relation of mastitis to the level of ascorbic acid and certain other constituents in milk. *J Dairy Sci.* 1941;24:41-50.
647. Renjifo X, Howard C, Kerkhofs P, Denis M, Urbain J, Moser M, et al. Purification and characterization of bovine dendritic cells from peripheral blood. *Vet Immunol Immunopathol.* 1997;60(1-2):77-88.
648. Repp R, Valerius T, Sandler A, Gramatzki M, Iro H, Kalden JR, et al. Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (Fc gamma RI, CD64) after *in vivo* application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood.* 1991;78(4):885-9.
649. Rescigno M, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells at the end of the millennium. *Immunol Cell Biol.* 1999;77(5):404-10.
650. Reymond N, Imbert AM, Devilard E, Fabre S, Chabannon C, Xerri L, et al. DNAM-1 and PVR regulate monocyte migration through endothelial junctions. *J Exp Med.* 2004;199(10):1331-41.
651. Richards MK. Pivotal role of granulocyte colony-stimulating factor in the development of progenitors in the common myeloid pathway. *Blood.* 2003;102(10):3562-8.

652. Richards S, Watanabe C, Santos L, Craxton A, Clark EA. Regulation of B-cell entry into the cell cycle. *Immunol Rev.* 2008;224:183-200.
653. Riollet C, Rainard P, Poutrel B. Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000;7(2):161-7.
654. Roesch M, Doherr M, Scharen W, Schallibaum M, Blum JW. Subclinical mastitis in dairy cows in Swiss organic and conventional production system. *J Dairy Res.* 2007;74(1):86-92.
655. Rogerson A, Rosemary KC, Sharpin, William JS. Analytical methods for immunoglobulins IgG1 and IgG2 in milk for colostrums and mastitis diagnosis and detection of adulteration of goat and sheep milk and products. In: Proceedings of an International Symposium on Immunology of Ruminant Mammary Gland; 2000 June 11-14; Stresa, Italy: International Dairy Federation; 2000.
656. Roitt IM, Brostoff J, Male DK. *Immunology.* 4th ed. London: Gower Medical Publishing Ltd; 1996.
657. Romaniukowa K., Rogoziewicz M.. Phagocytic activity of leucocytes from uterine secretion of cows after retention of placenta. 1978. *Bull Vet Inst. Pulway,* 22, 56-62
658. Romaniukowa K., Rogoziewicz M.. Phagocytic activity of uterine leucocytes collected from cows following delivery of dead or weak calves. 1979. *Bull Vet Inst, Pulway,* 23, 35-48.
659. Rooijackers SH, Ruyken M, Roos A, Daha MR, Presanis JS, Sim RB, et al. Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat Immunol.* 2005;6(9):920-7.
660. Roos D, de Boer M, Kuribayashi F, Meischl C, Weening RS, Segal AW, et al. Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood.* 1996;87(5):1663-81.
661. Roos D, van Bruggen R, Meischl C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect.* 2003;5(14):1307-15.
662. Rørvig S, Honore C, Larsson LI, Ohlsson S, Pedersen CC, Jacobsen LC, et al. Ficolin-1 is present in a highly mobilizable subset of human neutrophil granules and associates with the cell surface after stimulation with fMLP. *J Leukoc Biol.* 2009;86(6):1439-49.
663. Rosenberg HF, Domachowske JB. Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens. *J Leukoc Biol.* 2001;70(5):691-8.
664. Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(1):9-22.
665. Roth JA, Kaeberle ML. *In vivo* effect of ascorbic acid on neutrophil function in healthy and dexamethasone treated cattle. *Am J Vet Res.* 1985;46(12):2434-6.
666. Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Engl J Med.* 1998;338(22):1592-600.
667. Rubin-Bejerano I, Fraser I, Grisafi P, Fink GR. Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(19):11007-12.

668. Rudin CM, Thompson CB. B-cell development and maturation. *Semin Oncol.* 1998;25(4):435-46.
669. Rutschman R, Lang R, Hesse M, Ihle JN, Wynn TA, Murray PJ. Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *J Immunol.* 2001;166(4):2173-7.
670. Saad AM, Concha C., Astrom G.. Alterations in neutrophil phagocytosis and lymphocyte blastogenesis in dairy cows around parturition. 1989. *J Vet Med B*, 36, 337-45.
671. Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* 2011;32(10):452-60.
672. Sahin K, Onderci M, Sahin N, Gursu MF, Kucuk O. Dietary vitamin C and folic acid supplementation ameliorates the detrimental effects of heat stress in Japanese quail. *J Nutr.* 2003;133(6):1882-6.
673. Sahinduran S, Albay MK. Supplemental ascorbic acid and prevention of neonatal calf diarrhoea. *Acta Vet Brno.* 2004;73:221-4.
674. Saito N, Pulford KA, Breton-Gorius J, Masse JM, Mason DY, Cramer EM. Ultrastructural localization of the CD68 macrophage associated antigen in human blood neutrophils and monocytes. *Am J Pathol.* 1991;139(5):1053-9.
675. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155(3):1151-64.
676. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J Exp Med.* 1994;179(4):1109-18.
677. Sallusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of CD4⁺ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol.* 2009;39(8):2076-82.
678. Salvesen G, Farley D, Shuman J, Przybyla A, Reilly C, Travis J. Molecular cloning of human cathepsin G: structural similarity to mast cell and cytotoxic T lymphocyte proteinases. *Biochemistry.* 1987;26(8):2289-93.
679. Sandholm M, Matilla T. Milk N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase) as an indicator for bovine mastitis. In: *Proceedings of the Symposium on Mastitis Control and Hygienic Production of Milk.* Finland: Espoo; 1986. p. 153-161.
680. Santos MV, Lima FR, Rodrigues PH, Barros SB, Laranja-Fonseca LF. Plasma ascorbate concentrations are not correlated with milk somatic cell count and metabolic profile in lactating and dry cows. *J Dairy Sci.* 2001;84(1):134-9.
681. Santos RL, Tsolis RM, Baumler AJ, et al. Hematologic and serum biochemical changes in *Salmonella ser typhimurium* - infected calves. *Am J Vet Res.* 2002;63(8):1145-50.
682. Sanz MJ, Kubes P. Neutrophil-active chemokines in *in vivo* imaging of neutrophil trafficking. *Eur J Immunol.* 2012;42(2):278-83.
683. Sasmono RT. Mouse neutrophilic granulocytes express mRNA encoding the macrophage colony-stimulating factor receptor (CSF-1R) as well as many other

- macrophage-specific transcripts and can transdifferentiate into macrophages *in vitro* in response to CSF-1. *J Leukoc Biol.* 2007; 82(1):111-23.
684. Sauberlich HE. Pharmacology of vitamin C. *Annu Rev Nutr.* 1994;14:371-91.
685. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 2000;407(6805):784-8.
686. Sawyer DW, Donowitz GR, Mandell GL. Polymorphonuclear neutrophils: An effective antimicrobial force. *Rev Infect Dis.* 1989;11 Suppl 7:S1532-44.
687. Sawyer RT, Strausbauch PH, Volkman A. Resident macrophage proliferation in mice depleted of blood monocytes by strontium-89. *Lab Invest.* 1982;46(2):165-70.
688. Schalm OW, Carroll EJ, Jain NC. Bovine mastitis. Philadelphia, USA: Lea & Febiger; 1971.
689. Schroeder J. Biology of basophils. In: Adkinson N, Bochner BS, Busse WW, Holgate ST, Lemanske RF, Simons FER, editors. *Middleton's allergy: principles and practice.* 7th ed. St. Louis: Mosby, Elsevier; 2009.
690. Schroeder JT, Kageyabotka A, Macglashan DW, et al. The interaction of cytokines with human basophils and mast cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 1995;107(1-3):79-81.
691. Schuler G, Thurner B, Romani N. Dendritic cells: From ignored cells to major players in T-cell-mediated immunity. *Int Arch Allergy Immunol.* 1997;112(4):317-22.
692. Schwager J, Schulze J. Modulation of interleukin production by ascorbic acid. *Vet Immunol Immunopathol.* 1998;64(1):45-57.
693. Schwarzenberger P, Huang W, Ye P, Oliver P, Manuel M, Zhang Z, et al. Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis. *J Immunol.* 2000;164(9):4783-9.
694. Scott MA, Stockham SL. Basophils and mast cells. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, editors. *Schalm's veterinary hematology.* 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2000: 308-17.
695. Segal AW. The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates, and mammals. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(4):604-18.
696. Segal AW, Abo A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends Biochem Sci.* 1993;18(2):43-7.
697. Segal AW, Dorling J, Coade S. Kinetics of fusion of the cytoplasmic granules with phagocytic vacuoles in human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemical and morphological studies.* *J Cell Biol.* 1980;85(1):42-59.
698. Segal AW, Geisow M, Garcia R, Harper A, Miller R. The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH. *Nature.* 1981;290(5805):406-9.
699. Seifi HA, Mohri M, Delaramy M, Harati M. Effect of short term over-supplementation of ascorbic acid on hematology, serum biochemistry, and growth performance of neonatal dairy calves. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(8-9):2059-62.
700. Seifi HA, Mokhber Dezfuly MR, Bolurchi M. The effectiveness of ascorbic acid in the prevention of calf neonatal diarrhoea. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1996;43(3):189-91.

701. Selsted ME, Martinez RJ. Lysozyme: primary bactericidin in human plasma serum active against *Bacillus subtilis*. *Infect Immun*. 1978;20(3):782-91.
702. Sender G. Threshold value of somatic cell count in udder total milk. In: Proceedings of the Symposium on Mastitis Control and Hygienic Production of Milk. Finland: Espoo; 1986. p. 147-153.
703. Sengelov H, Boulay F, Kjeldsen L, Borregaard N. Subcellular localization and translocation of the receptor for *N*-formylmethionylleucyl-phenylalanine in human neutrophils. *Biochem J*. 1994;299(Pt 2):473-9.
704. Sengeløv H, Follin P, Kjeldsen L, Lollike K, Dahlgren C, Borregaard N. Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *J Immunol*. 1995;154(8):4157-65.
705. Sengeløv H, Kjeldsen L, Borregaard N. Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol*. 1993;150(4):1535-43.
706. Sengeløv H, Kjeldsen L, Diamond MS, Springer TA, Borregaard N. Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils, *J Clin Invest*. 1993;92(3):1467-76.
707. Sengeløv H, Nielsen MH, Borregaard N. Separation of human neutrophil plasma membrane from intracellular vesicles containing alkaline phosphatase and NADPH oxidase activity by free flow electrophoresis. *J Biol Chem*. 1992;267(21):14912-7.
708. Sharma N. Alternative approach to control intramammary infection in dairy cows - A review. *Asian J Anim Vet Adv*. 2007;2(2):50-62.
709. Sharma N, Singh NK, Bhadwal MS. Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview. *Asian-Aust J Anim Sci*. 2011;24(3):429-38.
710. Hussen J, Düvel A, Sandra O, Smith D, Sheldon IM, et al. Phenotypic and functional heterogeneity of bovine blood monocytes. *PLoS ONE*. 2013;8(8):e71502.
711. Shepers AJ, Lam TJGM, Schukken YH, Wilmink JBM, Hanekamp WJA. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. *J Dairy Sci*. 1997;80(8):1833-40.
712. Shi G, Bryant R, Riese R, Verhelst S, Driessen C, Li Z, et al. Role for cathepsin F in invariant chain processing and major histocompatibility complex class II peptide loading by macrophages. *J Exp Med*. 2000;191(7):1177-86.
713. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(3):151-61.
714. Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(1):19-30.
715. Sierig G, Cywes C, Wessels MR, Ashbaugh CD. Cytotoxic effects of streptolysin o and streptolysin s enhance the virulence of poorly encapsulated group a streptococci. *Infect Immun*. 2003;71(1):446-55.
716. Sinha S, Watorek W, Karr S, Giles J, Bode W, Travis J. Primary structure of human neutrophil elastase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(8):2228-32.
717. Sivakumar AVN, Singh G, Varshney VP. Antioxidants supplementation on acid base balance during heat stress in goats. *Asian-Aust J Anim Sci*. 2010;23(11):1462- 8.

718. Skjeflo EW, Christiansen D, Espevik T, Nielsen EW, Mollnes TE. Combined inhibition of complement and CD14 efficiently attenuated the inflammatory response induced by *Staphylococcus aureus* in a human whole blood model. *J Immunol*. 2014;192(6):2857-64.
719. Slauch JM. How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Mol Microbiol*. 2011;80(3):580-3.
720. Slifman NR, Loegering DA, McKean DJ, Gleich GJ. Ribonuclease activity associated with human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein. *J Immunol*. 1986;137(9):2913-7.
721. Smith KL, Todhunter DA. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. *J Dairy Sci*. 1985;68(6):1531-53.
722. Smits E, Burvenich C, Guidry AJ, Heyneman R, Massart-Leën A. Diapedesis across mammary epithelium reduces phagocytotic and oxidative burst of bovine neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol*. 1999;68(2-4):169-76.
723. Smits E, Burvenich C, Heyneman R. Simultaneous flow cytometric measurement of phagocytic and oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes in whole blood. *Vet Immunol Immunopathol*. 1997;56(3-4):259-69.
724. Smits E, Cifrian E, Guidry AJ, Rainard P, Burvenich C, Paape MJ. Cell culture system for studying bovine neutrophil diapedesis. *J Dairy Sci*. 1997;56(3-4):259-69.
725. Sokol CL, Barton GM, Farr AG, Medzhitov R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol*. 2008;9(3):310-8.
726. Song E, Ouyang N, Horbelt M, Antus B, Wang M, Exton MS. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cellular Immunol*. 2000;204(1):19-28.
727. Soter NA. Mast cell in cutaneous inflammatory disorders. *J Invest Dermatol*. 1983;80 Suppl:22s-25s.
728. Soumelis V, Liu YJ. From plasmacytoid to dendritic cell: Morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation. *Eur J Immunol*. 2006;36(9):2286-92.
729. Spencer LA, Weller PF. Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights. *Immunol Cell Biol*. 2010;88(3):250-6.
730. Sperandio M, Smith ML, Forlow SB, Olson TS, Xia L, McEver RP, P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules. *J Exp Med*. 2003;197(10):1355-63.
731. Spicer SS, Hardin JH. Ultrastructure, cytochemistry, and function of neutrophil leukocyte granules. A review. *Lab Invest*. 1969;20(5):488-97.
732. Staali L, Bauer S, Morgelin M, Bjorck L, Tapper H. *Streptococcus pyogenes* bacteria modulate membrane traffic in human neutrophils and selectively inhibit azurophilic granule fusion with phagosomes. *Cell Microbiol*. 2006;8(4):690-703.
733. Stafford JL, Neumann NF, Belošević M. Macrophage - mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit Rev Microbiol*. 2002;28(3):187-248.
734. Stanojević S, Krnjaić D. Gljivični mastitisi goveda. Zbornik radova Simpozijuma Mastitis i kvalitet mleka; 2001 Maj 30-Jun 02; Vrnjačka Banja, Srbija; 2001.

735. Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:261-92.
736. Stein JV, Cheng G, Stockton BM, Fors BP, Butcher EC, von Andrian UH. L-selectin-mediated leukocyte adhesion *in vivo*: microvillous distribution determines tethering efficiency, but not rolling velocity. *J Exp Med.* 1999;189(1):37-50.
737. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med.* 1992;176(1):287-92.
738. Steinbach KH, Schick P, Trepel F, Raffler H, Döhrmann J, Heilgeist G, et al. Estimation of kinetic parameters of neutrophilic, eosinophilic, and basophilic granulocytes in human blood. *Blut.* 1979;39(1):27-38.
739. Steinberg BE, Grinstein S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci STKE.* 2007;2007:e11
740. Steinman RM, Inaba K. Myeloid dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 1999;66(2):205-8.
741. Stevanović J, Borozan S, Jović S, Ignjatović I. Fiziologija slobodnih radikala. *Vet glasnik.* 2011;65:95-107.
742. Stevanović J, Radovanović A, Merćep D. Apoptoza kao način umiranja ćelije; signali, biohemijske i morfološke karakteristike. U: 23. Seminar za inovacije znanja veterinarara. 2002 Feb 13-14. Beograd; 2002.
743. Stevens DL, Mitten J, Henry C. Effects of alpha and theta toxins from *Clostridium perfringens* on human polymorphonuclear leukocytes. *J Infect Dis.* 1987;156(2):324-33.
744. Stieler A, Bernardo BS, Donovan GA. Neutrophil and monocyte function in neonatal dairy calves fed fresh or frozen colostrum. *Int J Appl Res Vet Med.* 2012;10(4):328-34.
745. Stockham SL, Scott MA. Leukocytes. In: *Fundamentals of veterinary clinical pathology.* 2nd ed. Ames: Blackwell; 2008: p. 75.
746. Stockwin LH, McGonagle D, Martin IG, Blair GE. Dendritic cells: immunological sentinels with a central role in health and disease. *Immunol Cell Biol.* 2000;78(2):91-102.
747. Stojanović LV, Katić VR. Veterinarsko-higijenski značaj mastitisa. *Vet glasnik.* 1994;48:149-53.
748. Stojanović LV, Petrović M, Katić VR. Značaj mastitisa u proizvodnji mleka. Zbornik radova Simpozijuma Mastitis i kvalitet mleka; 2001 Maj 30-Jun 02; Vrnjačka Banja, Srbija; 2001.
749. Struyf S, Proost P, Lenaerts J, Stoops G, Wuyts A, Damme JV. Identification of a blood-derived chemoattractant for neutrophils and lymphocytes as a novel CC chemokine Regakine-1. *Blood.* 2001;97(8):2197-204.
750. Styrud B. Species variation in neutrophil biochemistry and function. *J Leukoc Biol.* 1989;46(1):63-74.
751. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 2010;31(8):318-24.
752. Sun L, Ye RD. Role of G protein-coupled receptors in inflammation. *Acta Pharmacol Sin.* 2012;33(3):342-50.

753. Sundd P, Pospieszalska MK, Cheung LS, Konstantopoulos K, Ley K. Biomechanics of leukocyte rolling. *Biorheology*. 2011;48(1):1-35.
754. Sutterwala FS, Noel GJ, Clynes R, Mosser DM. Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J Exp Med*. 1997;185(11):1977-85.
755. Sutterwala FS, Noel GJ, Salgame P, Mosser DM. Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fc γ receptor type I. *J Exp Med*. 1998;188(1):217-22.
756. Swanson JA, Baer SC. Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol*. 1995;5(3):89-93.
757. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*. 2009;325(5940):612-6.
758. Takada K, Ohno N, Yadomae T. Binding of lysozyme to lipopolysaccharide suppresses tumor necrosis factor production *in vivo*. *Infect Immun*. 1994;62(4):1171-5.
759. Takahashi E, Matsui T, Wakamatsu S, Yuri N, Shiojiri Y, Matsuyama R, et al. Serum vitamin C concentration in fattening and fattened beef cattle. *Anim Sci J*. 1999;70:J199-J122 (in Japanese).
760. Takizawa H, Boettcher S, Manz MG. Demand-adapted regulation of early hematopoiesis in infection and inflammation. *Blood*. 2012;119(13):2991-3002.
761. Tanaka M, Kamiya Y, Suzuki T, Kamiya M, Nakai Y. Relationship between milk production and plasma concentrations of oxidative stress markers during hot season in primiparous cows. *Anim Sci J*. 2008;79(4):481-6.
762. Tanida N, Ohno N, Adachi Y, Matsuura M, Nakano M, Kiso M, et al. Modification of immunopharmacological activities of synthetic monosaccharide lipid A analogue, GLA60, by lysozyme. *J Biochem*. 1992;112(5):616-23.
763. Tapper H, Grinstein S. Fc receptor-triggered insertion of secretory granules into the plasma membrane of human neutrophils: selective retrieval during phagocytosis. *J Immunol*. 1997;159(1):409-18.
764. Tarling JD, Lin HS, Hsu S. Self-renewal of pulmonary alveolar macrophages: evidence from radiation chimera studies. *J Leukoc Biol*. 1987;42(5):443-6.
765. Theilgaard-Monch K, Jacobsen LC, Borup R, Rasmussen T, Bjerregaard MD, Nielsen FC, et al. The transcriptional program of terminal granulocytic differentiation. *Blood*. 2005;105(4):1785-96.
766. Theilgaard-Monch K, Jacobsen LC, Nielsen MJ, Rasmussen T, Udby L, Gharib M, et al. Haptoglobin is synthesized during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and released by neutrophils in response to activation. *Blood*. 2006;108(1):353-61.
767. Theilgaard-Monch K, Knudsen S, Follin P, Borregaard N. The transcriptional activation program of human neutrophils in skin lesions supports their important role in wound healing. *J Immunol*. 2004;172(12):7684-93.
768. Thomas WR, Holt PG. Vitamin C and immunity: an assessment of the evidence. 1978. *Clin Exp Immunol* 32:370-9

769. Thornton RB, Wiertsema SP, Kirkham LAS, Rigby PJ, Vijayasekaran S, Coates HL, et al. Middle ear effusion of children with recurrent acute otitis media - a potential treatment target. PLoS ONE. 2013;8(2):e53837.
770. Tizard IR. Veterinary immunology. 5th ed. New Delhi, India: Harcourt Brace and Company Asia Private Ltd; 1996.
771. Tizard IR. Veterinary immunology. 9th ed. E-book: ISBN: 978-1-4557-0362-3; 2013.
772. Toutain PL, Bechu D, Hidiroglou M. Ascorbic acid disposition kinetics in the plasma and tissues of calves. Am J Physiol. 1997;273(5 Pt 2):R1585-97.
773. Tsao CS. An overview of ascorbic acid chemistry and biochemistry. In: Packer L, Fuchs J, editors. Vitamin C in health and disease. New York: Marcel Decker Inc; 1997: 25-58.
774. Tschopp CM, Spiegl N, Didichenko S, Lutmann W, Julius P, Virchow JC, et al. Granzyme B, a novel mediator of allergic inflammation: its induction and release in blood basophils and human asthma. Blood. 2006;108(7):2290-9.
775. Tuerlinckx D, Vermylen C, Brichard B, Ninane J, Cornu G. Disseminated *Mycobacterium avium* infection in a child with decreased tumour necrosis factor production. Eur J Pediatr. 1997;156(3):204-6.
776. Turner J, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ, Lehrer RI. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. Antimicrob Agents Chemother. 1998;42(9):2206-14.
777. Tyler JW, Wilson RC, Dowling P. Treatment of subclinical mastitis. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 1992;8(1):17-28.
778. Udby L, Calafat J, Sørensen OE, Borregaard N, Kjeldsen L. Identification of human cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) as a matrix protein in a subset of peroxidase-negative granules of neutrophils and in the granules of eosinophils. J Leukoc Biol. 2002;72(3):462-9.
779. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. PLoS Pathog. 2009;5(10):e1000639.
780. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. Cell Microbiol. 2006 Apr;8(4):668-76.
781. Urošević M, Boboš S, Gagrčin M, Bugarski D, Pušić I. Uticaj načina držanja muznih krava na higijensku ispravnost mleka. U: Zbornik radova sa Jugoslovenskog mlekarskog simozijuma Savremeni trendovi u mlekarstvu. 2002 Apr 17-21. Vrnjačka Banja; Beograd: Zajednica stočarstva; 2002. p. 134-139.
782. Vakanjac S, Pavlović M, Pavlović V, Obrenović S. Immunoprophylaxis *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows. Acta Vet (Beogr). 2008;58(2-3):221-30.
783. Valerius T, Repp R, Kalden JR, Platzer E. Effects of IFN on human eosinophils in comparison with other cytokines. A novel class of eosinophil activators with delayed onset of action. J Immunol. 1990;145(9):2950-8.
784. Valli VEO. Normal and benign reactive hematopoietic tissues. In: Veterinary comparative hematopathology. Ames: Blackwell; 2007.

785. Valore EV, Ganz T. Posttranslational processing of defensins in immature human myeloid cells. *Blood*. 1992;79(6):1538-44.
786. van Dalen CJ, Whitehouse MW, Winterbourn CC, Kettle AJ. Thiocyanate and chloride as competing substrates for myeloperoxidase. *Biochem J*. 1997;327(Pt 2):487-92.
787. van Eeden SF, Klut ME, Walker BAM, et al. The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *J Immunol Methods*. 1999;232(1-2):23-43.
788. van Furth R. Production and migration of monocytes and kinetics of macrophages. In: van Furth R, editor. *Mononuclear phagocytes*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1992: 3-12.
789. van Merris V, Meyer E, Duchateau L, Blum J, Burvenich C. All-Trans Retinoic acid is increased in the acute phase related hypoproteinemia during *Escherichia coli* mastitis. *J Dairy Sci*. 2004;87(4):980-7.
790. van Oostveldt K, Paape MJ, Burvenich C. Apoptosis of bovine neutrophils following diapedesis through a monolayer of endothelial and mammary epithelial cells. *J Dairy Sci*. 2002;85(1):139-47.
791. van Vliet SJ, den Dunnen J, Gringhuis SI, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity. *Curr Opin Immunol*. 2007;19(4):435-40.
792. Varol C, Vallon-Eberhard A, Elinav E, et al. Intestinal *lamina propria* dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity*. 2009;31(3):502-12.
793. Venet F, Lepape A, Monneret G. Clinical review: flow cytometry perspectives in the ICU from diagnosis of infection to monitoring of injury-induced immune dysfunctions. *Crit Care*. 2011;15(5):231.
794. Venge P, Bystrom J, Carlson M, Hakansson L, Karawacjzyk M, Peterson C, et al. Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease. *Clin Exp Allergy*. 1999;29(9):1172-86.
795. Vercelli D. Immunobiology of IgE. In: Adkinson N, Bochner BS, Busse WW, Holgate ST, Lemanske RF, Simons FER, editors. *Middleton's allergy: principles and practice*. 7th ed. St. Louis: Mosby, Elsevier; 2009.
796. Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell*. 1993;73(3):469-85.
797. Vidarsson G, van der Pol WL, van den Elsen JM, Vilé H, Jansen M, Duijs J, et al. Activity of human IgG and IgA subclasses in immune defense against *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J Immunol*. 2001;166(10):6250-6.
798. Vieira OV, Botelho RJ, Grinstein S. Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J*. 2002;366(Pt 3):689-704.
799. Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59(9):1428-59.
800. Vliagoftis H, Befus AD. Mast cells at mucosal frontiers. *Curr Mol Med*. 2005;5(6):573-89.
801. Voehringer D, Shinkai K, Locksley RM. Type 2 immunity reflects orchestrated recruitment of cells committed to IL-4 production. *Immunity*. 2004;20(3):267-77.

802. Voehringer D, van Rooijen N, Locksley RM. Eosinophils develop in distinct stages and are recruited to peripheral sites by alternatively activated macrophages. *J Leukoc Biol.* 2007;81(6):1434-44.
803. von Kockritz-Blickwede M, Goldmann O, Thulin P, Heinemann K, Norrby-Teglund A, Rohde M, et al. Phagocytosis independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood.* 2008;111(6):3070-80.
804. von Kockritz-Blickwede M, Nizet V. Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. *J Mol Med (Berl).* 2009;87(8):775-83.
805. von Wendt G. C-Vitamin studien: C-Vitamin in der Kuhmilch. *Skand Arch Physiol.* 1938;80(3):398-402.
806. Vos Q, Lees A, Wu ZQ, Snapper CM, Mond JJ. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol Rev.* 2000;176:154-70.
807. Voss OH, Batra S, Kolattukudy SJ, Gonzalez-Mejia ME, Smith JB, Doseff AI. Binding of caspase-3 prodomain to heat shock protein 27 regulates monocyte apoptosis by inhibiting caspase-3 proteolytic activation. *J Biol Chem.* 2007;282(34):25088-99.
808. Voyich JM, Braughton KR, Sturdevant DE, Whitney AR, Said-Salim B, Porcella SF, et al. Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils. *J Immunol.* 2005;175(6):3907-19.
809. Voyich JM, Musser JM, DeLeo FR. *Streptococcus pyogenes* and human neutrophils: a paradigm for evasion of innate host defense by bacterial pathogens. *Microbes Infect.* 2004;6(12):1117-23.
810. Voyich JM, Sturdevant DE, Braughton KR, Kobayashi SD, Lei B, Virtaneva K, et al. Genome-wide protective response used by group A *Streptococcus* to evade destruction by human polymorphonuclear leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(4):1996-2001.
811. Walker F. IL6/sIL6R complex contributes to emergency granulopoietic responses in G-CSF- and GM-CSF-deficient mice. *Blood.* 2008;111(8):3978-85.
812. Wall RJ, Powell AM, Paape MJ, Kerr DE, Bannerman DD, Pursel VG, et al. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Biotechnol.* 2005;23(4):445-51.
813. Wang J, Slungaard A. Role of eosinophil peroxidase in host defense and disease pathology. *Arch Biochem Biophys.* 2006;445(2):256-60.
814. Wang S, Voisin MB, Larbi KY, Dangerfield J, Scheiermann C, Tran M, et al. Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils. *J Exp Med.* 2006;203(6):1519-32.
815. Wang Y, Chen Y, Xin L, Beverley SM, Carlsen ED, Popov V, et al. Differential microbicidal effects of human histone proteins H2A and H2B on *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Infect Immun.* 2011;79(3):1124-33.
816. Wang Y, Li M, Stadler S, et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol.* 2009;184(2):205-13.
817. Wariss PD. Monitoring pre-slaughter stress in pigs by adrenal ascorbic acid depletion. In: Wegger I, Tagwerker FJ, Moustgaard J, editors. *Proceedings of the Workshop on*

- Ascorbic Acid in Domestic Animals. Copenhagen: The Royal Danish Agricultural Society; 1984: p. 107-113
818. Warner HR, Athens JW. An analysis of granulocyte kinetics in blood and bone marrow. *Ann N Y Acad Sci.* 1964;113:523-36.
819. Warrington R, Watson W, Kim HL, Antonetti FR. An introduction to immunology and immunopathology. Allergy, Asthma, and Clinical Immunology : Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology. 2011;7(Suppl 1):S1. doi:10.1186/1710-1492-7-S1-S1.
820. Wartha, F., K. Beiter, B. Albiger, J. Fernebro, A. Zychlinsky, S. Normark, and B. Henriques-Normark. Capsule and *d*-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. 2007.*Cell. Microbiol.* 9:1162-1171
821. Washko, P., Rotrosen, D., M. Levine. Ascorbic acid transport and accumulation in human neutrophils. 1989. *J. Biol. Chem.* 264, 18996-19002.
822. Washko PW, Wang YH, Levine M. Ascorbic-acid recycling in human neutrophils. *J. Biol. Chem.*1993;268:15531–15535.
823. Wasmoen TL, Bell MP, Loegering DA, Gleich GJ, Prendergast FG, McKean DJ. Biochemical and amino acid sequence analysis of human eosinophil granule major basic protein. *J Biol Chem.* 1988;263(25):12559-63.
824. Watson DL. Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in dairy heifers. *Res Vet Sci.* 1992;53(3):346-53.
825. Webster SJ, Daigneault M, Bewley MA, et al. Distinct cell death programs in monocytes regulate innate responses following challenge with common causes of invasive bacterial disease. *J Immunol.* 2010;185(5):2968-79.
826. Wegger I, Moustgaard J. Age related variations in plasma ascorbic acid in calves. *K Vet Landbohøjsk Inst Sterilitetforsk Arsberet.* 1982;1982:16.
827. Weiss D, Perman V. Assessment of the hematopoietic system in ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1992;8(2):411-28
828. Weiss DJ, Wardrop KJ. Schalm's veterinary hematology. Ames, IA: Blackwell Publishing Ltd; 2010.
829. Weiss DJ, Welle M, Moritz A, et al. Evaluation of leukocyte surface markers in dogs with septic and nonseptic inflammatory diseases. *Am J Vet Res.* 2004;65(1):59-63.
830. Weiss WP. Effect of dietary vitamin C on concentrations of ascorbic acid in plasma and milk. *J Dairy Sci.* 2001;84(10):2302-7.
831. Weiss WP, Hogan JS. Effects of dietary vitamin C on neutrophil function and responses to intramammary infusion of lipopolysaccharide in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci.* 2007;90(2):731-9.
832. Weiss WP, Hogan JS, Smith KL. Changes in vitamin C concentrations in plasma and milk from dairy cows after an intramammary infusion of *Escherichia coli*. *J Dairy Sci.* 2004 Jan;87(1):32-7.
833. Weller PF, Monahan-Earley RA, Dvorak HF, Dvorak AM. Cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. Subcellular isolation and analysis of arachidonate incorporation. *Am J Pathol.* 1991;138(1):141-8.

834. Wentworth P, Jr, McDunn JE, Wentworth AD, Takeuchi C, Nieva J, Jones T, et al. Evidence for antibodycatalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation. *Science*. 2002;298(5601):2195-9.
835. Wijffels JF, de Rover Z, Beelen RH, et al. Macrophage subpopulations in the mouse spleen renewed by local proliferation. *Immunobiology*. 1994;191(1):52-64.
836. Wiktor-Jedrzejczak W, Gordon S. Cytokine regulation of the macrophage (M phi) system studied using the colony stimulating factor1-deficient op/op mouse. *Physiol Rev*. 1996;76(4):927-47.
837. Williams MR, Azcutia V, Newton G, Alcaide P, Luscinskas FW. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends Immunol*. 2011;32(10):461-9.
838. Wimley WC, Selsted ME, White SH. Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci*. 1994;3(9):1362-73.
839. Winterbourn CC. Neutrophil oxidants: production and reactions. In: Das DK, Essman WB, editors. *Oxygen radicals: systemic events and disease process*. Basel: Karger; 1990: p. 31.
840. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest*. 2000;80(5):617-53.
841. Wofford JA, Wright JR. Surfactant protein A regulates IgG-mediated phagocytosis in inflammatory neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293(6):L1437-43.
842. Wong J, Johnston B, Lee SS, Bullard DC, Smith CW, Beaudet AL, et al. A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature. *J Clin Invest*. 1997;99(11):2782-90.
843. Woo SR, Barletta RG, Sotos J, Czuprynski CJ, Hart AP. Bovine monocytes and a macrophage cell line differ in their ability to phagocytose and support the intracellular survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2006;110(1-2):109-20.
844. Woodfin A, Voisin MB, Beyrau M, Colom B, Caille D, Diapouli FM, et al. The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils *in vivo*. *Nat Immunol*. 2011;12(8):761-9.
845. Wright SD, Griffin FM, Jr. Activation of phagocytic cells' C3 receptors for phagocytosis. *J Leukoc Biol*. 1985;38(2):327-39.
846. Wright SD, Reddy PA, Jong MT, Erickson BW. C3bi receptor (complement receptor type 3) recognizes a region of complement protein C3 containing the sequence Arg-Gly-Asp. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(7):1965-8.
847. Wright SD, Silverstein SC. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J Exp Med*. 1983;158(6):2016-23.
848. Wróbel A, Łukaszyńska B, Kędzierska J. The effect of peroxyntirite and some antioxidants on the rate of osmotic hemolysis of bovine erythrocytes. *Cell Mol Biol Lett*. 2003;8(2):455-60.

849. Wu W, Chen Y, Hazen SL. Eosinophil peroxidase nitrates protein tyrosyl residues. Implications for oxidative damage by nitrating intermediates in eosinophilic inflammatory disorders. *J Biol Chem*. 1999;274(36):25933-44.
850. Wynn TA. Basophils trump dendritic cells as APCs for T H2 responses. *Nat Immunol*. 2009;10(7):679-81.
851. Xu H, Hu C, Gong R, Chen Y, Ren N, Xiao G, et al. Evaluation of a novel chimeric B cell epitope-based vaccine against mastitis induced by either *Streptococcus agalactiae* or *Staphylococcus aureus* in mice. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18(6):893-900.
852. Xu J, Zhang XM, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med*. 2009;15(11):1318-21.
853. Yamaguchi Y, Suda T, Ohta S, et al. Analysis of the survival of mature human eosinophils: interleukin - 5 prevents apoptosis in mature human eosinophils. *Blood*. 1991;78(10):2542-7.
854. Yamamoto K, Johnston RB, Jr Dissociation of phagocytosis from stimulation of the oxidative metabolic burst in macrophages. *J Exp Med*. 1984;159(2):405-16.
855. Yamauchi K, Tomita M, Giehl TJ, Ellison III RT. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infect Immun*. 1993;61(2):719-28.
856. Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2000;68(1):9-14.
857. Yang D, Chen Q, Rosenberg HF, Rybak SM, Newton DL, Wang ZY, et al. Human ribonuclease A superfamily members, eosinophil-derived neurotoxin and pancreatic ribonuclease, induce dendritic cell maturation and activation. *J Immunol*. 2004;173(10):6134-42.
858. Yang D, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, et al. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptorlike 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med*. 2000;192(7):1069-74.
859. Yang D, Chen Q, Su SB, Zhang P, Kurosaka K, Caspi RR, et al. Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2-MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses. *J Exp Med*. 2008;205(1):79-90.
860. Yang D, Rosenberg HF, Chen Q, Dyer KD, Kurosaka K, Oppenheim JJ. Eosinophil-derived neurotoxin (EDN), an antimicrobial protein with chemotactic activities for dendritic cells. *Blood*. 2003;102(9):3396-403.
861. Yen JT, Pond WG. Effect of dietary vitamin C addition on performance, plasma vitamin C and hematic iron status in weanling pigs. *J Anim Sci*. 1981;53(5):1292-6.
862. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN, Zbytnuik LD, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med*. 2012;18(9):1386-93.
863. Yokoyama WM, Kim S, French AR. The dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:405-29.
864. Young KM, Moriello KA, Peickert H. Characterization of eosinophil progenitor cells in feline bone marrow. *Am J Vet Res*. 1997;58(4):348-53.

865. Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med.* 2008;14(9):949-53.
866. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 2009;16(11):1438-44.
867. Zarbock A, Ley K, McEver RP, Hidalgo A. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood.* 2011;118(26):6743-51.
868. Zerbe H., Schuberth HJ, Hoedemaker M., Grunert E., Leibold W.. A new model system for endometritis, basic concepts and characterization of phenotypic and functional properties of bovine uterine neutrophils, *Theriogenology.* 1996. 46, 1339-56.
869. Zempleni J, Rucker RB, McCormick DB, Suttie JW. *Handbook of vitamins.* 4th ed. Boca Raton, Florida: CRC Press Taylor & Francis Group; 2007.
870. Zhang B, Hirahashi J, Cullere X, Mayadas TN. Elucidation of molecular events leading to neutrophil apoptosis following phagocytosis: cross-talk between caspase 8, reactive oxygen species, and MAPK/ERK activation. *J Biol Chem.* 2003;278(31):28443-54.
871. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:445-89.
872. Zimmermann N, Hogan SP, Mishra A, et al. Murine eotaxin - 2: a constitutive eosinophil chemokine induced by allergen challenge and IL - 4 overexpression. *J Immunol.* 2000;165(10):5839-46.
873. Zinkernagel RM. *The Nobel Lectures in Immunology. The Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1996. Cellular immune recognition and the biological role of major transplantation antigens.* *Scand J Immunol.* 1997;46(5):421-36.

BIOGRAFIJA DOKTORANDA

Saša (Vladimira) Mlinar je rođen 21.10.1974. godine u Zadru, R. Hrvatska. gde je završio osnovnu školu „Vladimir Nazor“. Srednju školu je započeo u Zadru („MIOC“- matematičko informatički obrazovni centar) školske 1990/91, a završio je u Beogradu (I beogradska gimnazija) 1993. godine.

Na Fakultet veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, upisao se školske 1993/94 godine, gde je i diplomirao u julu 1999. godine sa prosečnom ocenom 9,00. Poslediplomske magistarske studije upisao je školske 1999/2000. na Klinici za porodiljstvo, sterilitet i V.O. i postao je stipendista Ministarstva za nauku i tehnologiju R. Srbije. U septembru 2000. godine, dobio je nagradu Norveške kraljevske ambasade kao jedan od 1000 najboljih studenata u R. Srbiji. Na doktorske akademske studije upisao se školske 2008/2009. godine na Fakultetu veterinarske medicine u Beogradu.

Po završetku osnovnih studija zaposlio se kao terenski veterinar u PVS „Zovet“ - Obrva (Kraljevo), gde je završio pripravnički staž i nastavio rad kao terenski veterinar. U martu 2002. godine, položio je državni ispit. U aprilu 2004. godine seli se u Džedu (Jeddah) u Saudijskoj Arabiji, gde radi kao veterinar u „Tahliah International Veterinary Clinic“ do aprila 2006. godine. Tokom 2006. godine imao je dva privremena radna aranžmana u Dohi, Katar (klinike: „Animal Care Center“ i „Veterinary Surgery“). Nakon toga se vraća u Srbiju gde od 2006. godine nastavlja rad u PVS „Zovet“ - Obrva, kao terenski veterinar. U periodu od 2007. do 2009. godine radi kao veterinar na farmi muznih krava „BD Agro A.D.“ u Dobanovcima. U septembru 2009. godine seli se u Abu Dabi (Abu Dhabi), UAE, gde radi kao veterinar u zoološkom vrtu („Emirates Park Zoo“). Krajem 2009. godine polaže veterinarski licencni ispit pred komisijom resornog ministarstva („Ministry of Water and Environment“) u Dubaiju i ubrzo posle toga postaje licencirani veterinar u UAE. Od jula 2010. godine do juna 2014. godine radi kao veterinar u „Energetic Panacea Veterinary Clinic“ (Dubai). U junu 2014. godine seli se sa porodicom u Muskat, glavni grad Sultanata Oman gde radi na formiranju nove klinike.

Odmah po dolasku u Muskat, polaže licencni ispit pred komisijom njihovog resornog ministarstva „Ministry of Agriculture and Fisheries“ u Muskatu i postaje licencirani veterinar u Omanu. Rad u novoformiranoj klinici („Sama Veterinary Clinic LLC“) započinje u julu iste godine, na poziciji menadžera klinike i glavnog veterinara, gde radi i danas.

Govori engleski jezik i služi se osnovama arapskog jezika. Oženjen je, suprugom Milenom Mlinar i ima dve kćerke.

9. IZJAVA O AUTORSTVU, IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA, IZJAVA O KORIŠĆENJU

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisan: Saša V. Mlinar

Broj upisa: 12/25 (12.11.2007. godine)

Izjavljujem

Da je doktorska disertacija pod naslovom:

"UTICAJ VISOKE DOZE C VITAMINA NA FUNKCIJE NEUTROFILNIH GRANULOCITA VISOKO-MLEČNIH KRAVA SA SUPKLINIČKIM MASTITISIMA"

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

U Novom Sadu, 14.02.2016. godine

Potpis doktoranda:



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Saša V. Mlinar

Broju pisa: 12/25 (12.11.2007. godine)

Studijski program: Doktorske akademske studije

Smer: Morfologija i fiziologija životinja

Naslovrada:

"UTICAJ VISOKE DOZE C VITAMINA NA FUNKCIJE NEUTROFILNIH GRANULOCITA VISOKO-MLEČNIH KRAVA SA SUPKLINIČKIM MASTITISIMA"

Mentor: Prof. dr Miodrag Lazarević

Potpisani Saša V. Mlinar

Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portal **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

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

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

U Novom Sadu, 14.02.2016. godine.

Potpis doktoranda:



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

**"UTICAJ VISOKE DOZE C VITAMINA NA FUNKCIJE NEUTROFILNIH
GRANULOCITA VISOKO-MLEČNIH KRAVA SA SUPKLINIČKIM
MASTITISIMA"**

- koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom format pogodnom za trajno arhiviranje.

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

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

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

U Novom Sadu, 14.02.2016. godine.

Potpis doktoranda:



1. Autorstvo – Dozvoljava te umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence iako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence iako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.