



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
DEPARTMAN ZA VETERINARSKU MEDICINU

***IN VITRO* ISPITIVANJA UTICAJA ENDOGENIH I
EGZOGENIH FAKTORA NA FUNKCIONALNU
AKTIVNOST NEUTROFILNIH GRANULOCITA
KRAVA U PERIPARTALNOM PERIODU**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Prof. dr Zdenko Kanački

Kandidat: DVM Marina Žekić Stošić

Novi Sad, 2018. godine

UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	DVM Marina Žekić Stošić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Zdenko Kanački, vanredni profesor
Naslov rada: NR	<i>In vitro</i> ispitivanja uticaja endogenih i egzogenih faktora na funkcionalnu aktivnost neutrofilnih granulocita krava u peripartalnom periodu
Jezik publikacije: JP	Srpski
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2018
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8

Fizički opis rada: FO	8 poglavlja / 165 stranica / 1 slika / 41 grafikon / 51 tabela/ 244 referenci / biografija
Naučna oblast: NO	Veterinarska medicina
Naučna disciplina: ND	Anatomija, histologija i fiziologija životinja
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	etarska ulja, fagocitoza, krave, metabolički profil, neutrofilni granulociti, respiratorni prasak
UDK	636.09: 636.2.084 (043.3)
Čuva se: ČU	Biblioteka Poljoprivrednog fakulteta, Novi Sad
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Hormonske i metaboličke promene, kao i energetska neravnoteža, mogu uticati na zdravlje, proizvodnju i reproduktivne performanse mlečnih krava. Kraj gestacije i početak laktacije kod muznih krava prati niz endokrinih i metaboličkih promena u organizmu i zbog toga je tranzicioni period (3 nedelje pre i 3 nedelje posle teljenja) veoma značajan. Promene koje prate ovaj period dovode do izmena u funkcijama ćelija imunskog sistema (i urođenog i stečenog), tako da mogu biti razlog manje ili više izražene imunosupresije i sve češćih supkliničkih i kliničkih poremećaja zdravlja i reprodukcije. Moguće posledice su: produženi servis period i rano isključenje mlečnih grla iz dalje proizvodnje (usled mastitisa i endometritisa). Ovo se ponekada dešava već u prvoj laktaciji.</p> <p>Neutrofilni granulociti su, kao prva linije odbrane, ključne ćelije u odbrani organizma od bakterija, virusa, gljivica, parazita i drugih stranih ćelija. Od funkcionalne aktivnosti ovih ćelija zavisi opšta otpornost samog organizma, a složena priroda imunskog sistema otežava razumevanje njegove smanjene funkcije u peripartalnom periodu. Iako postoje različite hipoteze o promenama funkcija neutrofilnih granulocita, kao prve linije odbrane organizma u tranzicionom periodu i dalje nije poznato koji faktori dovode do imunosupresije. Tokom tranzicionog perioda uočavaju se promene u vrednostima pojedinih biohemijskih parametara krvi, međutim, njihova koncentracija nije konstantna tokom čitavog perioda da bi, sa</p>

sigurnošću, mogla da objasni nastanak imunosupresije.

Cilj ove doktorske disertacije je bio da se utvrdi stepen funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita iz pune krvi zdravih krava u periodu pre i posle teljenja, kao i njena korelacija sa metaboličkim i hematološkim promenama koje prate ovaj period. Ispitivana je grupa od 21 krave, koje su praćene u periodu od treće nedelje pre partusa, do treće nedelje nakon partusa, u 7 nedeljnih termina. Poslednje uzorkovanje krvi je izvršeno šest nedelja posle teljenja. Važan deo ovog rada je predstavljalo *in vitro* ispitivanje mogućnosti modulacije procesa fagocitoze i respiratornog prasaka neutrofilnih granulocita različitim biljnim ekstraktima i jednim antiseptikom (Armenicum®). Ova laboratorijska ispitivanja su vršena u uzorcima pune krvi 6 nasumično odabranih krava, u nedelji pre i nedelji posle teljenja, odnosno u periodu kada se može očekivati imunosupresija. Stepem fagocitne sposobnosti i respiratornog prasaka određivan je protočnom citometrijom.

Prosečne vrednosti imunoloških, biohemijskih i parametara krvi, uprkos manjim oscilacijama uglavnom su bile u saglasnosti sa povoljnom kliničkom slikom, proizvodnim i reproduktivnim rezultatima i ukazivale su na dobar tranzicioni menadžment. U ispitivanoj grupi mlečnih krava, najviše prosečne koncentracije NEMK su registrovane u prvoj i drugoj nedelji nakon teljenja ($1,05 \pm 0,50$ mmol/l i $0,81 \pm 0,67$ mmol/l). Vrednosti BHB takođe rastu nakon teljenja, ali samo do vrednosti od $0,74 \pm 0,43$ mmol/l, što je ispod donje granice za supkliničku ketozu ($> 1,2$ mmol/l). Povišene koncentracije NEMK i BHB mogu da utiču na migratornu sposobnost, fagocitozu i respiratorni prasak neutrofilnih granulocita i drugih leukocita. Međutim, u ovom istraživanju koncentracije BHB, NEMK, kao i ostalih indikatora metabolizma jetre i koncentracije minerala u krvi su bile povoljne u posmatranom periodu i pogodovale su aktivaciji neutrofilnih granulocita.

Tretman pune krvi različitim koncentracijama etarskih ulja (EU) i antiseptika nije uticao na fagocitnu sposobnost neutrofilnih granulocita.

	<p>Vrednosti dobijene u našem istraživanju ukazuju da nije došlo do stimulacije fagocitoze u uzorcima pune krvi pod dejstvom ispitivanih koncentracija EU i antiseptika, ni pre ni posle teljenja. U uzorcima bez tretmana, neutrofilni granulociti, pobuđeni jakim stimulatorom (PMA), ispoljili su veliku spremnost za fagocitozu, kako pre (87,15%), tako i posle teljenja (90,13%). Dodatna stimulacija egzogenim faktorima nije bila moguća, jer se ovako visok procenat neutrofilnih granulocita, koji su ispoljili aktivnost u smislu fagocitoze u uzorcima pune krvi smatra maksimalnim odgovorom ovih ćelija na stimulans.</p> <p>Statistički značajna odstupanja su ustanovljena između vrednosti respiratornog praska neutrofilnih granulocita između nedelje pre i nedelje nakon teljenja kod istih tretmana. Najbolji efekat u pravcu pojačavanja intenziteta reakcije respiratornog praska neutrofilnih granulocita nakon teljenja, u odnosu na vrednosti pre teljenja, je imao 0,1% ekstrakt mente. Tretmani timijanom (0,0125% ekstrakt) i Armenicum-om® (razređenje 1:800 i razređenje 1:1600) su pozitivno uticali i na intenzitet i na indeks respiratornog praska neutrofilnih granulocita.</p> <p>Na osnovu dobijenih rezultata može da se zaključi da imunosupresija posle teljenja mlečnih krava, koje nisu u negativnom energetske bilansu nije dominantna pojava. Imunski sistem se "ponaša" racionalno i doznno zavisno u odnosu na pretnje i izazove tranzicionog perioda: porastom neposredno pred teljenja, visokom aktivnošću u prvim nedeljama i brzom stabilizacijom šest nedelja nakon teljenja.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	12.5.2016.
Datum odbrane: DO	

<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>1. Zdenko Kanački/ Dr /vanredni profesor/ Poljoprivredni fakultet, Univerzitet Novi Sad</p> <hr/> <p>2. Dragica Stojanović/ Dr /redovni profesor / naučni savetnik/ Poljoprivredni fakultet, Univerzitet Novi Sad</p> <hr/> <p>3. Miodrag Lazarević/ Dr /redovni profesor/ Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet Beograd</p> <hr/>
---	---

University of Novi Sad
Faculty of agriculture

Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD. Thesis
Author: AU	Marina Žekić Stošić, DVM
Mentor: MN	Zdenko Kanački, PhD, Associate Professor
Title: TI	<i>In vitro</i> investigations of the endogenous and exogenous factors influence on the functional activity of neutrophil granulocytes in the cows blood during transition period
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina, Novi Sad
Publication year: PY	2018
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture Novi Sad, Trg Dositeja Obradovica 8, 21000 Novi Sad
Physical description: PD	8 chapters/ 165 pages / 41 figures / 1 image / 51 tables / 244 references / biography
Scientific field SF	Veterinary medicine
Scientific discipline SD	Anatomy, histology and physiology of animals

Subject, Key words SKW	Cows, essential oils, metabolic profile, neutrophil granulocytes, phagocytosis, respiratory burst.
UC	636.09: 636.2.084 (043.3)
Holding data: HD	The Library of the Faculty of Agriculture, Novi Sad
Note: N	None
Abstract: AB	<p>Hormonal and metabolic changes, as well as energy disbalans might have an impact on health, productivity and reproductive performances of dairy cows. The end of gestation and the beginning of lactation in dairy cows are accompanied by a series of endocrine and metabolic changes in their body. Therefore the transition period (3 weeks before and 3 weeks after partus) is of great importance. Changes during this period might be the reason for compromised immune system cells functions (both of innate and adaptive arm) resulting in a more or less expressed immunosuppression. They also might lead to the frequent subclinical and clinical disorders of health and reproduction. Possible consequences are: prolonged service period and an early exclusion of dairy cows from further production due to the mastitis and endometritis occurrence. In some cases, this happens already in the first lactation. As the first line of defense, neutrophil granulocytes are the key cells in the body protection from bacteria, viruses, fungies, parasites and other foreign cells. General resistance of the organism itself, depends on the functional activity of these cells. Complex nature of the immune system complicates understanding of its lowered function in peripartal period. It is still unknown which factors lead to immunosuppression, although, there are different hypothesis about changed functions of neutrophil granulocytes, as the first line of defense, during the transition period. Moreover, during the transition period, concentrations of some blood biochemical parameters are not stable, so this can not explain the genesis of immunosuppression with acceptable certainty.</p> <p>The aim of this PhD thesis was to estimate functional activity of neutrophil granulocytes in the blood of healthy cows before and after</p>

calving, as well to establish possible correlations with metabolic and hematology parameters changes during this period. A group of 21 Simmental cows was monitored during the seven weeks period, starting from the 3 weeks prior to calving until 3 weeks post calving. All blood collections were performed in the regular weekly terms and a final samples were taken at 6th week post calving. An important part of this study was *in vitro* evaluation of the possible modulation effects of different plant extracts and one antiseptic (Armenicum®) on the phagocytosis and respiratory burst of neutrophil granulocytes. These laboratory tests were performed in samples of whole blood, from 6 randomly chosen cows, one week before and one week after calving, when immunosuppression might be expected. The phagocytosis and respiratory burst activity of neutrophil granulocytes were determined by flow cytometry.

The average values of immunological, biochemical and blood parameters, despite small variations were in line with favorable clinical picture, satisfactory production and reproduction results, and pointed to a good transition management. The highest average concentration of NEFA were registered in the 1st and 2nd week after calving (1.05 ± 0.50 mmol/L and 0.81 ± 0.67 mmol/L). Values for BHB also increased after calving but only to 0.74 ± 0.43 mmol/L, being lower than the values indicating subclinical ketosis (higher than 1.2 mmol/L). Higher concentration of NEFA and BHB can influence migratory ability, phagocytosis and respiratory burst activity of neutrophil granulocytes and other leukocytes. However, in this study the concentrations of BHB, NEFA and other indicators of liver metabolism, as well as minerals concentration in the blood, were optimal and favorable for the activation of neutrophil granulocytes.

Whole blood treatment with different concentrations of essential oils (EO) and antiseptic did not influence the ability of neutrophil granulocytes for phagocytosis. Values obtained in this study confirm that EO

	<p>and antiseptic did not stimulate phagocytosis in the whole blood samples before calving and neither after it. In the samples with no treatment (control samples), neutrophil granulocytes were stimulated with strong stimulator (PMA) and showed high ability for phagocytosis before calving (87.15%) as well as after it (90.13%). Such a high percentage of neutrophil granulocytes that showed phagocytic activity were considered as the highest response of these cells on stimulants, so no additional stimulation of phagocytosis activity of neutrophil granulocytes was possible.</p> <p>Statistically significant differences were established between respiratory burst activity of neutrophil granulocytes with same treatment, in the week before and week after calving. When we compared effects of treatments on the intensity of neutrophil granulocytes respiratory burst after calving, with respect to pre-calving values, it was possible to conclude that 0.1% extract of the mint had the best effect. Neutrophil granulocytes in the whole blood samples treated with 0.0125% extract of thyme, as well as with Armenicum® (dilutions 1: 800 and 1: 1600), showed stimulation of both intensity and respiratory burst index in neutrophil granulocytes.</p> <p>In accordance with the results obtained in this study, we were able to conclude that in dairy cows with no negative energy balance, immunosuppression after calving is not a dominant phenomenon. The immune system is "behaving" rationally and in a dose-dependent manner on the threats and challenges of the transition period: increasing activity before calving, keeping it at the high level during the first week after calving and followed by stabilization at 6th week after calving.</p>
Accepted on Senate on: AS	12.5.2016.
Defended: DE	

Thesis Defend Board:
DB

1. Zdenko Kanački PhD, Associate Professor,
Faculty of Agriculture, Novi Sad
(Primary supervisor)

2. Dragica Stojanović, PhD, Senior scientific
associate, Full Professor, Faculty of Agriculture,
Novi Sad

3. Miodrag Lazarević, PhD, Full Professor,
Faculty of veterinary medicine, Belgrade

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	5
2.1. Odbrambeni (imunski) sistem.....	5
2.1.1. Urođeni imunitet.....	5
2.1.1.1. Efektorne ćelije nespecifičnog imunološkog odgovora	5
2.1.2. Stečeni imunitet.....	7
2.1.2.1. Efektorne ćelije stečenog imunskog odgovora.....	7
2.2. Prva linija odbrane	9
2.2.1. Inflamatorni odgovor.....	9
2.2.2. Neutrofilni granulociti - na putu do žarišta infekcije.....	10
2.2.3. Neutrofilne granule.....	11
2.2.4. Funkcije neutrofilnih granula.....	12
2.3. Funkcije neutrofilnih granulocita.....	13
2.3.1. Fagocitoza	13
2.3.2. Respiratorni prasak.....	13
2.3.2.1. Uloga mijeloperoksidaze.....	14
2.4. Uloga neutrofilnih granulocita kod infektivnih oboljenja	15
2.4.1. Funkcije hemoatraktanata	17
2.5. Prekomerno aktiviranje neutrofilnih granulocita	18
2.5.1. Nekroza neutrofilnih granulocita.....	18
2.5.2. Apoptoza neutrofilnih granulocita.....	18
2.5.3. Autofagocitoza neutrofilnih granulocita	19
2.5.4. Netoza neutrofilnih granulocita.....	19
2.6. Tranzicioni (prelazni) period krava.....	20
2.6.1. Hormonalne promene	21
2.6.2. Energetske potrebe krava u tranzicionom periodu	22
2.6.3. Poremećaji energetskeg metabolizma krava	23
2.6.3.1. Lipoliza	23
2.6.3.2. Negativni energetske bilans	24
2.6.3.2.1. Neesterifikovane masne kiseline.....	24
2.6.3.2.2. Beta-hidroksi-butirat	25
2.6.3.3. Promene u potrebama za mineralnim materijama.....	26
2.6.3.4. Ostale metaboličke promene u peripartalnom periodu.....	28

2.7. Uticaj metaboličkih i endokrinih promena na funkcionalnu aktivnost neutrofilnih granulocita	29
2.7.1. Negativni energetska bilans	30
2.7.1.1. Glukoza i funkcionalna aktivnost neutrofilnih granulocita	30
2.7.1.2. Uticaj promena u koncentraciji neesterifikovanih masnih kiselina i β -hidroksi-butarata na funkcionalnu aktivnost neutrofilnih granulocita	31
2.7.2. Uticaj promena koncentracije kalcijuma u serumu na funkcionalnu aktivnost neutrofilnih granulocita	33
2.7.3. Uticaj uree na funkcionalnu aktivnost neutrofilnih granulocita	34
2.7.4. Imunosupresija u tranzicionom periodu	35
2.8. Uticaj egzogenih faktora na imunski sistem	36
2.8.1. Ishrana i imunitet	37
2.8.2. Etarska ulja	39
2.8.2.1. Sastav etarskih ulja	39
2.8.2.2. Antioksidativna aktivnost etarskih ulja	40
2.8.2.2. Antiinflamatorna aktivnost etarskih ulja	41
2.8.2.3. Imunomodularna aktivnost etarskih ulja	42
2.8.3. Familija <i>Lamiaceae</i>	42
2.8.3.1. <i>Mentha piperita</i>	42
2.8.3.2. <i>Satureja Montana</i>	43
2.8.3.3. <i>Thymus vulgaris</i>	44
2.8.4. Armenicum®	45
3. CILJEVI I ZADACI	47
4. MATERIJAL I METODE	48
4.1. Materijal	48
4.1.1. Ogledne životinje	48
4.1.2. Biljni materijal i antiseptik	49
4.1.2.1. Obrada biljnog materijala	49
4.1.2.2. Izolovanje etarskih ulja	49
4.1.2.3. Antiseptik	50
4.2. Metode	50
4.2.1. Uzorkovanje i transport uzoraka	51
4.2.2. Određivanje i kvantifikacija hematoloških parametara krvi	51
4.2.3. Biohemijske analize metaboličkih parametara u krvi	52
4.2.4. Ocena telesne kondicije krava	53
4.2.5. Kvantitativni i kvalitativni test stepena fagocitoze kod neutrofilnih granulocita	53
4.2.6. Kvantitativni i kvalitativni test respiratornog praska kod neutrofilnih granulocita	54

4.2.7. Protočna citometrija.....	55
4.2.8. Kvalitativno određivanje aktivnosti mijeloperoksidaze u serumu.....	56
4.2.9. Ispitivanje uticaja različitih egzogenih faktora na funkcionalnu aktivnost neutrofilnih granulocita	56
4.2.9.1. Priprema rastvora etarskih ulja	57
4.2.9.2. Priprema rastvora antiseptika za ogled:	58
4.2.10. Statistička obrada podataka	58
5. REZULTATI	60
5.1. Vrednosti metaboličkih parametara.....	60
5.3. Funkcionalna aktivnost neutrofilnih granulocita u krvi mlečnih krava	86
5.3.1. Rezultati testa fagocitne sposobnosti neutrofilnih granulocita (Phagotest®)	86
5.3.2. Rezultati testa sposobnosti neutrofilnih granulocita da izvrše respiratorni prasak (Phagoburst®).....	89
5.3.3. Rezultati za aktivnost mijeloperoksidaze u neutrofilnim granulocitima mlečnih krava	93
5.4. Ocena telesne kondicije krava uključenih u ispitivanja.....	94
5.5. Uticaj egzogenih faktora na funkcionalnu aktivnost neutrofilnih granulocita.....	95
5.5.1. Rezultati određivanja procenta neutrofilnih granulocita koji su reagovali fagocitozom posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum® nedelju dana pre i nedelju dana posle teljenja	95
5.5.2. Rezultati određivanja intenziteta fluorescencije neutrofilnih granulocita koji su reagovali fagocitozom posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum® nedelju dana pre i nedelju dana posle teljenja.....	98
5.5.3. Rezultati određivanja indeksa fagocitoze neutrofilnih granulocita posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum® nedelju dana pre i nedelju dana posle teljenja.....	101
5.5.4. Rezultati određivanja procenta neutrofilnih granulocita koji su reagovali respiratornim praskom posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum® nedelju dana pre i posle teljenja	104
5.5.5. Rezultati određivanja intenziteta fluorescencije tokom respiratornog praska neutrofilnih granulocita posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum® nedelju dana pre i nedelju dana posle teljenja.....	107
5.5.6. Rezultati određivanja indeksa respiratornog praska neutrofilnih granulocita posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum® nedelju dana pre i nedelju dana posle teljenja	110
6. DISKUSIJA.....	114
6.1. Vrednosti metaboličkih parametara mlečnih krava	114
6.1-3. Koncentracija ukupnih proteina, albumina i globulina u krvnom serumu.....	114
6.1.4. Koncentracija uree u krvnom serumu	115
6.1.5. Koncentracija neesterifikovanih masnih kiselina	117
6.1.6. Koncentracija β -hidroksi-butirata u krvnom serumu	118

6.1.7. Koncentracija bilirubina u krvnom serumu.....	119
6.1.8. Koncentracija glukoze u krvnom serumu	120
6.1.9. Aktivnost aspartat aminotransferaze u krvnom serumu.....	120
6.1.10. Aktivnost alanin amino-transferaze u krvnom serumu	121
6.1.11. Koncentracija kalcijuma u krvnom serumu krava	121
6.1.12. Koncentracija fosfora u krvnom serumu krava	122
6.1.13. Koncentracija magnezijuma u krvnom serumu krava.....	123
6.2. Vrednosti hematoloških parametara mlečnih krava	124
6.3. Pokazatelji funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita	127
6.3.1. Funkcionalna aktivnost neutrofilnih granulocita, Phagotest® - test procene fagocitne sposobnosti neutrofilnih granulocita	128
6.3.2. Funkcionalna aktivnost neutrofilnih granulocita, Phagoburst® - test procene respiratornog praska neutrofilnih granulocita	132
6.3.3. Aktivnost mijeloperoksidaze - procena funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita	135
6.3.4. Rezime pokazatelja funkcionalne aktivnost neutrofilnih granulocita.....	137
6.4. Uticaj egzogenih faktora na funkcionalnu aktivnost neutrofilnih granulocita.....	143
6.4.1. Rezime uticaja egzogenih faktora na funkcionalnu aktivnost neutrofilnih granulocita.....	148
7. ZAKLJUČCI	150
8. SPISAK LITERATURE	152

Zahvaljujem se,

mentoru prof. dr Zdenku Kanačkom na nesebičnoj pomoći i podršci,

internom mentoru dr Radimiru Ratajcu na ideji, svesrdnoj pomoći i dragocnim savetima pri izvođenju eksperimentalnog dela istraživanja,

članovima komisije, prof. dr Dragici Stojanović i prof. dr Miodragu Lazareviću, na uloženom dragocenom vremenu i stručnoj pomoći,

kolegama i Direktorcu Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad“ na saradnji i kolegijalnosti,

Odeljenju za reprodukciju, za tehničku podršku i veliku pomoć tokom realizacije ovog istraživanja.

Veliko hvala dr Sari Savić i Odeljenju za serološka imunološka i biohemijska ispitivanja na neizmernoj podršci.

Posebnu zahvalnost dugujem porodici na razumevanju i strpljenju.

Marina Žekić Stošić

Doktorska disertacija je urađena u okviru projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije: „Istraživanje farmakoloških karakteristika antimikrobnih agenasa, uvođenje novih tehnoloških rešenja i alternativnih metoda profilakse s ciljem da se poboljša kontrola infektivnih oboljenja domaćih životinja“. Projekat br: TR 31071 (2011-2019).

1. UVOD

Poljoprivredna proizvodnja predstavlja jednu od najvažnijih grana privrede svake zemlje i sa aspekta biološkog opstanka društva, svakako je i najvažnija. U okviru poljoprivredne proizvodnje, stočarstvo predstavlja vodeću granu. U stočarskoj proizvodnji, goveda daju najveći doprinos proizvodnji mleka i mesa, proizvoda koji sadrže proteine visoke biološke vrednosti i koji se koriste, ne samo za ishranu stanovništva, već i kao sirovine za prehrambenu industriju. Proizvodnja zdrave, prirodne hrane i proizvoda vrhunskog kvaliteta prema zahtevima domaćeg i inostranog tržišta je od velikog značaja za svaku zemlju. Međutim, u novim tržišnim uslovima, takođe je neophodno povećati profit što, po pravilu, podrazumeva primenu naprednih tehnologija. Značajno mesto među njima predstavlja genetska selekcija i u skladu sa novim tendencijama u nauci, ostvareni su značajni rezultati u razvoju genetike u stočarstvu. Strogom selekcijom rasa goveda na mlečnost, značajno se povećala proizvodnja mleka. Muzne krave su nekada davale od 12 do 15 litara mleka dnevno dok im se sada nameće produktivnost od 50 litara. Ovako visoki proizvodni zahtevi neminovno se odražavaju na životni vek krava (Oltenucu and Broom, 2010). Krave Holštajn-frizijske rase su živele i do 10 godina, ali je sada je njihov životni vek znatno skraćen. Intenzivna proizvodnja, visoka gustina naseljenosti u štalama, iscrpljivanje životinja radi što većih prinosa, kao i različite odluke i mere vlasnika farmi, klanica i mlekara u cilju maksimalnog profita najviše utiču na kvalitet i dužinu života krava.

Selekcija koja je vršena je u cilju visoke proizvodnje mleka negativno je uticala i na reprodukciju grla. Poznato je da su posledice visoke mlečnosti maksimalno iscrpljivanje mlečnih grla i kontinuirani metabolički stres, što se neminovno odražava na životni i proizvodni vek jedinki (Oltenucu and Broom, 2010). Visokomlečne muzne krave su postale podložnije supkliničkim i kliničkim poremećajima zdravlja i reprodukcije, a rezultat ovakvog postupanja je produženi vremenski interval od teljenja do uspostavljanja uspešne koncepcije (servis period) (Smith i sar., 1983; Otto-a i sar., 1991; Senatore i sar., 1996). Ovo ima za posledicu rano isključivanje mlečnih krava iz dalje proizvodnje, ponekada već u prvoj laktaciji.

Najveći značaj za zdravlje krava, proizvodnju mleka i ukupnu ekonomičnost proizvodnje ima peripartalni period. Prelazak iz kasne steonosti u intenzivnu proizvodnju mleka predstavlja veliko metaboličko opterećenje koje nastaje usled promena u hormonskoj

ravnoteži i pod snažnim je uticajem homeoretskog delovanja i ograničene sposobnosti adaptacionih mehanizama (Pires, 2013). U kratkom vremenskom periodu, od samo nekoliko nedelja, muzne krave bivaju izložene velikim izazovima fiziološke i nutritivne, pa čak i psihološke prirode. Kraj gestacije i početak laktacije prati niz endokrinih i metaboličkih promena u organizmu. Najizraženije su promene u koncentraciji kalcijuma, glukoze, neesterifikovanih masnih kiselina i β – hidroksi-butirata (Quiroz-Rocha i sar., 2012; Hayirli i sar., 2011; Fiore i sar., 2017). Smanjeno unošenje hrane u kasnoj gestaciji, neposredno pre i naročito nakon teljenja, dovodi do značajnog energetskeg deficita u odnosu na potrebe jedinke u ovom periodu tako da je neophodna adaptacija organizma na novonastalo stanje (Bertoni i sar., 2008; Bionaz i sar., 2007; Trevisi i sar., 2012; Trevisi i sar., 2014). Peripartalni (tranzicioni) period, koji obuhvata tri nedelje pre i tri nedelje posle teljenja, je upravo najkritičniji period života visokomlečnih muznih krava. Danas se smatra da se svaka jedinka prilagođava na nove uslove samo do određenog nivoa. U ovom razdoblju nastaje najveći broj različitih zdravstvenih poremećaja koji ostavljaju posledice i tokom trajanja laktacije. Najčešća oboljenja u peripartalnom periodu su mlečna groznica, mastitis, bolest masne jetre, ketoza, zaostala posteljica, endometritis, hipomagnezemija i dislokacija sirišta (Fiore i sar., 2017). Ona nastaju kao rezultat delovanja većeg broja faktora koji su međusobno zavisni, odnosno kao posledica mnogobrojnih endokrinih i metaboličkih promena karakterističnih za ovaj period. Povećana incidenca zdravstvenih problema, koji se primećuju tokom peripartalnog perioda, delimično se pripisuje negativnom energetskeg bilansu (NEB), koji je česta pojava nakon partusa muznih krava (Thatcher i sar., 2010). Da bi se zadovoljile potrebe mlečne žlezde intenzivira se metabolizam i povećava se mobilizacija masti iz telesnih depoa. Tada nastupa NEB, jer muzna krava ne može hranom da zadovolji svoje energetske potrebe. Povećani zahtevi mlečne žlezde za glukozom ne mogu se zadovoljiti glukoneogenezom koja se odigrava u jetri. Snažna mobilizacija masti i preuzimanje nezasićenih masnih kiselina iz krvi, dovode do nakupljanja triglicerida u jetri i različitog stepena zamašćenja hepatocita što utiče na njihovu funkcionalnu sposobnost i smanjenje koncentracije glikogena u ćelijama jetre (Nikolić i sar., 2003; Van Knegsel i sar., 2007). Iskorišćavanje glukoze iz jetre je dvostruko veće pri kraju graviditeta i to traje sve do druge nedelje posle partusa (Aschenbach i sar., 2010). Nastupa hipoglikemija i ubrzana je potrošnja raspoloživog glikogena iz jetre što ima za posledicu povlačenje rezervi iz drugih telesnih depoa. Pri tome se smanjuje dostupnost glukoze za ostala tkiva. Glukoza je vrlo bitan izvor energije za neutrofilne granulocite i razumljivo je, da se pored negativnog energetskeg bilansa, javlja i poremećaj njihove funkcije. Stanja prouzrokovana negativnim energetskeg bilansom i stanja prouzrokovana

imunološkom supresijom su međusobno zavisna. Uticaj NEB u periodu tranzicije zavisi pre svega od intenziteta i dužine trajanja ovog stanja, ali i od sposobnosti krave da se prilagodi novonastalim uslovima, kao i da se u što kraćem vremenskom periodu mlečno grlo vrati na pozitivan energetski bilans. Radi smanjenja incidence bolesti i što bržeg oporavka nakon teljenja, odnosno perioda intenzivne laktacije, neophodno je poboljšanje zdravlja u tranzicionom periodu. Kako je dobrobit krava u prvom planu, potrebno je identifikovati glavne uzroke pojave oboljenja i neplodnosti na farmi. U ovom smislu, postoji nekoliko pravaca i strategija koje omogućavaju brži povratak krave u standardne okvire. Kratkoročne strategije podrazumevaju poboljšavanje ishrane, uslova smeštaja i higijene, kao i doprinos menadžmenta farme u cilju smanjenja uticaja stresa iz okoline (Von Keyseklingk i sar., 2009). Genetska selekcija životinja predstavlja dugoročnu strategiju koja promovise uzgoj mlečnih grla sa povećanom otpornošću na određene bolesti. Ciljanom selekcijom se favorizuju grla koja se bolje adaptiraju, kako na životne uslove, tako i na stres koji sa sobom nosi intenzivna proizvodnja mleka. Ovakve strateške odluke imaju svoje velike prednosti koje se ogledaju u najvećoj meri u značajno povećanoj mlečnosti, ali zato imaju i nedostatke. Jedan od najočiglednijih nedostataka se ogleda u smanjenoj otpornosti na pojedine bolesti. Činjenica je, da do danas, različite kratkoročne i dugoročne strategije za poboljšanje zdravstvenog statusa muznih krava u tranzicionom periodu još uvek nisu dovele do optimalnog rešenja. Značajna sredstva i vreme se troše u pokušajima da se obezbedi što uspešniji prelazak iz perioda zasušenja u stanje rane laktacije, ali ukupne investicije odnosno gubici tokom ovog perioda veoma teško mogu realno da se kvantifikuju.

Neutrofilni granulociti su kao prva linije odbrane, ključne ćelije u odbrani organizma od bakterija, virusa, gljivica, parazita i drugih stranih ćelija. Njihova primarna funkcija, kao važnih komponenti odbrambenog sistema, je fagocitoza. Efikasna eliminacija antigena je jedino moguća zahvaljujući sinhronizovanim aktivnostima neutrofilnih granulocita i ostalih ćelija urođenog imuniteta (monocita, makrofaga i dentritičnih ćelija) (Sengeløv i sar., 1993; Soehnlein i sar., 2009). Međutim, složena priroda imunskog sistema otežava razumevanje smanjene funkcije u peripartalnom periodu. Kako svi činioci (endogene i egzogene promene) utiču međusobno jedni na druge, nije još uvek jasno koji faktori dovode do nastanka imunosupresije. Takođe, nije u potpunosti jasno da li se kombinacijom određenih faktora uticaj na imunski sistem povećava ili umanjuje. Promene u vrednostima pojedinih biohemijskih parametara, karakteristične za tranzicioni period, nisu dovoljne da objasne nastanak imunosupresije, jer njihova koncentracija nije konstantna tokom čitavog perioda. To

ukazuje da uticaj na fagocitnu sposobnost neutrofilnih granulocita imaju i drugi faktori. Pojačana aktivnost mlečne žlezde takođe utiče na slabljenje funkcija neutrofilnih granulocita (Piccione i sar., 2012; Quiroz- Rocha i sar., 2009). Oslabljena funkcija neutrofilnih granulocita uočena je u periodu pre teljenja, kao i nakon teljenja i kod krava kod kojih je izvršena mastektomija. Kod ovakvih krava se funkcije neutrofilnih granulocita brže ponovo uspostavljaju, dok se kod krava u laktaciji inhibicija održava i tokom nekoliko nedelja nakon teljenja (Thatcher i sar., 2010). U cilju pravovremenog prepoznavanja patogena neophodno je poboljšati opštu funkcionalnu aktivnost ćelija prve linije odbrane, kako bi se sprečile kaskadne reakcije koje vode ka imunosupresiji i smanjila incidenca pojave oboljenja kod krava u peripartalnom periodu.

Cilj ove doktorske disertacije je da se utvrdi stepen funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita iz pune krvi zdravih krava u periodu pre i posle teljenja kao i korelacija sa metaboličkim i hematološkim promenama koji prate ovaj period. Važan deo ovog rada predstavlja *in vitro* ispitivanje mogućnosti imunomodulacije pod dejstvom biljnih ekstrakata i antiseptika na proces fagocitoze i respiratornog praska neutrofilnih granulocita iz pune krvi krava u cilju poboljšanja njihove funkcionalne aktivnosti. Ova laboratorijska ispitivanja su vršena u nedelji pre i nedelji posle teljenja odnosno u periodu najizraženije imunosupresije.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Odbrambeni (imunski) sistem

Očuvanje integriteta kompleksnih sistema živih organizama moguće je samo delovanjem različitih i efikasnih odbrambenih mehanizama. Ovi mehanizmi čine imunski sistem životinja koji je veoma dinamičan i složen. Imunitet može biti nespecifični ili urođeni i specifični ili stečeni. Na ovaj način se jedinke štite od štetnih uticaja iz okoline, ali i od sopstvenih izmenjenih ćelija koje nastaju spontanim mutacijama i koje mogu postati štetne.

2.1.1. Urođeni imunitet

Komponente urođenog imunskog sistema predstavljaju prvu liniju odbrane organizma od štetnih mikroorganizama. One imaju sposobnost da brzo reaguju i prepoznaju zaražene i oštećene ćelije ili ćelije strane organizmu i da ih eliminišu. Međutim, urođeni imunski sistem nije u stanju da prepozna neke specifične patogene mikroorganizme i ćelije ovog sistema nemaju sposobnost imunološkog pamćenja.

Osnovna nespecifična linija odbrane samog domaćina je fizička barijera, kojom se organizam štiti prirodnim preprekama (koža, sluzokože i sekreti). Njen primarni zadatak je da se spreči prodor bakterija, virusa ili gljivica. Ukoliko mikroorganizmi ipak uspeju da savladaju ove barijere i dospeju do tkiva, dolazi do niza, često kaskadnih reakcija, koje predstavljaju nespecifičan ili specifičan imunski odgovor domaćina.

Sve ćelije imunskog sistema nastaju od hematopoetske matične (stem) ćelije od koje se diferenciraju sve krvne ćelije i sve ćelije imunskog sistema (Georgopoulos, 2002).

2.1.1.1. Efektorne ćelije nespecifičnog imunološkog odgovora

Efektorne ćelije nespecifičnog imunološkog odgovora su leukociti (makrofagi, dendritične ćelije i tzv. ćelije ubice - engl: *natural killer cells*). Sve bele krvne ćelije imaju jedro i po tome se razlikuju od eritrocita i trombocita. Leukociti se na osnovu prisustva granula u citoplazmi dele na granulocite i agranulocite. Granulociti se na osnovu afiniteta granula prema kiselim i baznim bojama i funkcionalnih karakteristika dalje dele na neutrofilne, eozinofilne i bazofilne granulocite.

Poluživot neutrofilnih granulocita u cirkulaciji iznosi svega nekoliko sati. Ukoliko dođe do prodora mikroorganizma u domaćina, oni se usmeravaju na mesto oštećenja u tkivima gde zajedno sa makrofagima vrše fagocitozu. U medicinskoj literaturi ih prvi put pominje Elie Metchnikov, koji je krupnije ćelije nazvao makrofagima, a sitnije mikrofagocitima (koji su danas označeni kao granulociti) i dokazao da su to ćelije sa fagocitnom aktivnošću (Segal, 2005). Neutrofilni granulociti, kao i ostale krvne ćelije nastaju proliferacijom i diferencijacijom od pluripotentne matične ćelije u kostnoj srži, gde dolazi do formiranja njihovih granula. Ovo je od presudne važnosti u borbi protiv stranih agenasa. Za razliku od mnogih životinjskih vrsta, gde neutrofilni granulociti čine većinu leukocita u krvi, ove ćelije kod goveda čine samo 25% od ukupnog broja leukocita. Kod zdrave teladi, prosečno vreme potrebno za stvaranje neutrofilnih granulocita iznosi 5,77 dana. Zreli neutrofilni granulociti napuštaju hematopoetski odeljak kostne srži i ulaze u vaskularne sinuse putujući migracionim kanalima između endotelnih ćelija. Prosečno vreme koje je potrebno da ćelija dospe u krvotok je sedam dana. Neutrofilni granulociti su vrlo pokretne bele krvne ćelije, sa kratkim životnim vekom, a poluživot u cirkulaciji im je 8,9 sati. Važni organi za uklanjanje oštećenih neutrofilnih granulocita su jetra, pluća i slezina (Paape i sar., 2003). Neutrofilni granulociti se mogu nalaziti u cirkulaciji i u tkivima. Oni koji migriraju u tkiva su mnogo aktivniji kao fagociti, nego oni koji se nalaze u krvotoku (Borregaard, 2010).

Eozinofilni granulociti deluju tako što oslobađaju histamin, glavni bazni protein i različite hidrolitičke enzime. Oni imaju važnu ulogu u borbi organizma protiv parazita i jedan su od ključnih faktora u nastanku alergijskih reakcija.

Bazofilni granulociti deluju tako što posle adekvatne stimulacije oslobađaju histamin, proteoglikane i citokine. Nakon stimulacije organizma alergenom, dokazano je brzo oslobađanje interleukina (IL): IL-4 i IL-13. U preraspodeli inflamatornih ćelija i eozinofilnih ćelija u tkivima centralnu ulogu ima IL-4 (Falcone i sar., 2000).

Monociti i makrofagi spadaju sa limfocitima u mononuklearne ćelije. Monociti su prekursori dendritičnih ćelija i zajedno sa njima čine antigen prezentujuće ćelije (APC engl. *antigen presenting cells*) - koji vrše ingestiju mikroorganizama i njihovo uništavanje (Yong-Jun Liu, 2001). Na površini nezrelih dendritičnih ćelija su lokalizovani TLR receptori (engl. *toll-like receptors*) i oni predstavljaju "senzore" za pojedine molekule mikroorganizama (Yong-Jun Liu, 2001; Hoebe i sar., 2004). Na ovim ćelijama se nalazi i glavni kompleks histokompatibilnosti (engl. *major histocompatibility complex* - MHC) II klase, kao i receptori za prepoznavanje ponavljajućih obrazaca patogena (PRR) (engl. *pattern recognition receptors*). Zahvaljujući ovim molekulima, nespecifični imunski sistem prepoznaje antigene.

Monociti nastaju u kostnoj kostnoj srži i ulaze u cirkulaciju, gde se zadržavaju oko 8 do 10 sati, a zatim migriraju u tkiva i pretvaraju se u zrele makrofage. Makrofagi imaju receptore za slobodan deo molekula antitela vezanih za antigene. Ovaj proces vezivanja antitela se naziva opsonizacija i u značajnoj meri poboljšava efikasnost fagocitoze.

Ćelije ubice su podgrupa T limfocita koja takođe nastaje u kostnoj srži. Kao efektorske ćelije urođenog imunskog sistema značajne su pri infekcijama ćelija virusima ili njihovim malignim alteracijama. Ove ćelije imaju sposobnost da prepoznaju fragmente virusa na površini inficiranih ćelija koje zatim uništavaju (Abbas i sar., 1994).

2.1.2. Stečeni imunitet

Adaptivni (stečeni) imunitet je izuzetno značajan za prepoznavanje i eliminaciju specifičnih patogena, ali uvek postoji izvesno kašnjenje u njegovoj akciji ili reakciji. U slučajevima kada nespecifični imunski odgovor ne može da eliminiše infektivni agens, dolazi do aktivacije specifičnog dela imunskog sistema. Efektorske ćelije stečenog imuniteta su T limfociti koji su odgovorni za ćelijski i B limfociti odgovorni za humoralni imunski odgovor. Limfociti imaju sposobnost da se putem krvi i limfe prenose kroz čitavo telo. Razmena koja postoji između limfnog sistema i krvotoka omogućava ovim ćelijama stalni nadzor u celom organizmu na eventualno prisustvo stranih mikroorganizama. Recirkulaciju limfociti izvode 1 - 2 puta dnevno ili dok ne propadnu, odnosno dok ne susretnu specifični antigen što će zatim usloviti dalje kaskadne reakcije (Butcher i Picker, 1996).

2.1.2.1. Efektorne ćelije stečenog imunskog odgovora

Efektorne ćelije stečenog imunskog odgovora su B i T limfociti. Za humoralni stečeni imunitet su odgovorni B limfociti i oni pod uticajem specifičnih antigena, sintetišu antitela - imunoglobuline. Imunoglobulini (Ig) se sastoje od dva teška i dva laka lanca povezana disulfidnim vezama. Svaki lanac ima svoje konstantne i varijabilne regione, a ovi drugi su specifični za određeni antigen. Nakon kontakta sa ekstracelularnim antigenom, neaktivisani B limfociti (engl. naive B-lymphocytes) se vezuju za njega ukoliko ga prepoznaju. Poslednji korak u diferencijaciji B limfocita je njihov prelazak u plazma ćelije koje stvaraju antitela. Nakon prepoznavanja antigena dolazi do proliferacije klona specifičnih B limfocita, koji zatim sintetišu antitela iste specifičnosti kao što su bili receptori u njihovoj membrani (Alberts

i sar., 2002). Posle neutralizacije antigena, plazma ćelije koje se nalaze u slezini su kratkoživeće i vrlo kratko sintetišu antitela, za razliku od plazma ćelije koje migriraju ka kostnoj srži (tzv. memorijski limfociti) i dugo ostaju u organizmu. Pri sledećem kontaktu sa istim antigenom, oni se veoma brzo aktiviraju i reaguju proizvodnjom velikog broja antitela iste specifičnosti (Takemori i sar., 2014). Za celularni stečeni imunitet su odgovorni T limfociti. Nakon prepoznavanja ćelije koja je napadnuta virusom ili prepoznavanja makrofaga sa fagocitovanim antigenom umnožavaju se do tada neaktivisani T limfociti (engl. *naive T-lymphocytes*). Na taj način dolazi do njihove proliferacije i formiranja efektorskih ćelija. Pomoćni T limfociti se vezuju za makrofage koji su fagocitovali mikroorganizme, vrše njihovu aktivaciju i pomažu razlaganje mikro-organizama. Druga grupa limfocita - citotoksični T limfociti, razlažu ćelije inficirane antigenom i tako neutrališu žarište infekcije. Nakon eliminisanja infekcije, u organizmu ostaju takozvani memorijski T limfociti, koji će znatno brže odgovoriti na sledeći prodor istog ili veoma sličnog sličnog antigena (Fearon i Locksley, 1996).

Za efikasnu odbranu organizma domaćina neophodna je koordinisana aktivnost urođenog i stečenog imuniteta (Hoebe i sar., 2004). Koliko su urođeni i stečeni imunitet usko povezani i međusobno se dopunjuju, dokazuje i činjenica da antigen prezentujuće ćelije kao deo urođenog imunskog odgovora imaju bitnu ulogu u aktivaciji T-limfocita, kao efektorskih ćelija stečenog imunskog odgovora. Slobodne antigene, T limfociti ne prepoznaju. Da bi T limfocit mogao da prepozna antigen, tj. da razlikuje sopstvene od stranih molekula, neophodno je da ono budu vezani za molekul glavnog histokompatibilnog kompleksa II. Na svojoj površini APC imaju TLR pomoću kojih prepoznaju antigene, a zatim stimulišu receptore MHC II klase, koji se takođe nalaze na njihovoj površini, usled čega dolazi do vezivanja antigena preko T ćelijskog receptora (TCR), čime T limfocit postaje funkcionalan (Pennock i sar., 2013). Za razliku od T limfocita, B limfociti mogu da prepoznaju antigene i da pod dejstvom antigena sazrevaju u plazma ćelije, koje zatim sintetišu antitela. Dok se ne uspostavi potpuni adaptivni imunski odgovor, može proći i do dve nedelje, što podrazumeva i aktivaciju adekvatnog broja nepobuđenih T i B ćelija (one koje nikad nisu bili izložene antigenu na koji mogu da odgovore), kao najvažnijih efektorskih ćelija ili postizanje zaštitnog titra imunoglobulina (Mallard i sar., 1998).

2.2. Prva linija odbrane

Neutrofilni granulociti se smatraju najvažnijim fagocitnim ćelijama u prvoj liniji odbrane. Može sa reći da oni na neki način koordinišu funkcije ćelija urođenog imuniteta (monociti/makrofagi/dendritične ćelije) što je od presudnog značaja za eliminaciju antigena. Neutrofilni granulociti imaju ključnu ulogu u odbrani organizma od bakterija, gljivica i protozoa, a ključ efikasne odbrane domaćina od mikroorganizama je rano prepoznavanje napadača (bakterija, virusa, gljivica, parazita i drugih stranih ćelija). Ingestija i ubijanje “uljeza” ili uklanjanje stranih molekula predstavljaju složen proces, koji zahteva koordinaciju većeg broja ćelijskih aktivnosti. Kao odgovor na povredu ili infekciju, obično nastaje inflamatorni odgovor posredovan neutrofilnim granulocitima.

2.2.1. Inflamatorni odgovor

Inflamatorni odgovor se može smatrati kaskadnom reakcijom u kojoj neutrofilni granulociti migriraju iz kostne srži u krv i infiltriraju se u tkiva. Odložena apoptoza i sinteza proinflamatornih medijatora čine ih dominantnim ćelijama u celokupnom zapaljenskom procesu (Wright i sar., 2010).

Kada mikroorganizam uspe da savlada fizičku barijeru domaćina i prodre do tkiva, makrofagi koji se nalaze u tkivima na mestu prodora i infekcije, primaju signal o tome. Tkivni makrofagi preko odgovarajućih receptora (TLR) za prepoznavanje molekulskih obrazaca patogena (engl. *pathogen-associated molecular pattern* - PAMP), prepoznaju posebne lipoproteinske strukture (koje nose bakterije) i dolazi do aktiviranja niza međusobno uslovljenih reakcija. Ukoliko nedostaje samo jedan od faktora prepoznavanja i aktiviranja ili je njegova funkcija inhibirana, doći će do promena u intenzitetu imunskog odgovora ili čak do njegovog izostanka. Kod goveda je otkriveno preko 10 različitih TLR i svaki od njih prepoznaje određene PAMP (Rinaldi i sar., 2010). Na primer, TLR4 prepoznaje lipopolisaharide gram-negativnih bakterija (*E. coli*) i molekule kao što su fibrinogen, “heat shock” protein i polipeptide, dok TLR2 prepoznaje peptidoglikane i lipoteihoičnu kiselinu gram-pozitivnih bakterija. Za prepoznavanje bakterijske dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) i ribonukleinske kiseline (RNK) tokom intracelularne infekcije je odgovoran TLR9 (Oviedo-Boyso i sar., 2007). Makrofagi nakon primljenog signala dalje aktiviraju endotelne ćelije. Aktivirane endotelne ćelije imaju zadatak da “uhvate” neutrofilne granulocite iz cirkulacije (krvotoka) i da ih usmere na mesto infekcije (Borregaard, 2010). Zatim sledi

inicijalno prijanjanje cirkulišućih neutrofilnih granulocita za aktivirani vaskularni endotel. Nakon aktiviranja neutrofilnih granulocita, dolazi do ekspresije proinflamatornih citokina i medijatora koji dalje utiču na imunski odgovor. Ekspresijom E-, P- i L- selektina neutrofilni granulociti čvršće prijanjanju uz endotelne ćelije i slede promene u vaskularnom endotelu.

Rezultat odgovora vaskularnog endotela je zapaljenski proces koji predstavlja kritičnu komponentu urođenog odbrambenog sistema, a karakterišu ga crvenilo, temperatura, otok i bol. Ovi simptomi su posledica intenziviranja cirkulacije usled povećavanja dijametra krvnih sudova. Kao rezultat međusobnog razdvajanja, do tada čvrsto vezanih endotelnih ćelija u zidu krvnih sudova, dolazi do povećane vaskularne propustljivosti i izlaska tečnosti i proteina iz krvi uz njihovu akumulaciju u tkivima. Posledično nastaje edem, koji je povezan sa zapaljenskim procesom (Sordillo, 2014). Zahvaljujući promenama u vaskularnom endotelu, neutrofilni granulociti dalje migriraju ka žarištu infekcije. Da bi neutrofilni granulociti, uopšte mogli da ispolje svoju funkciju, bez obzira gde je žarište lokalizovano, od suštinskog značaja je njihovo usmereno kretanje.

2.2.2. Neutrofilni granulociti - na putu do žarišta infekcije

Izlazak neutrofilnih granulocita iz cirkulacije se odvija uglavnom na nivou postkapilarnih venula, čiji je zid prilično tanak, a prečnik opet dovoljno mali da neutrofilni granulociti mogu da ostvare kontakt sa zidom suda i dovoljno velik da ga neutrofilni granulociti ne zatvore kada se čvrsto pripoje za endotel. Usmereno kretanje se odvija u pravcu gradijenta hemoatraktanata. Važni hemoatraktanti za privlačenje neutrofilnih granulocita kod goveda iz periferne cirkulacije ka mestu infekcije su komponente komplemanta (C3a i C5a), lipopolisaharidi (LPS) i interleukini (IL-1, IL-2 i IL-8). Ovi hemoatraktanti se vezuju za specifične receptore plazma membrane neutrofilnih granulocita i tako usmeravaju njihovu migraciju prema žarištima upale (Paape i sar., 2003).

Prelazak iz cirkulacije se odvija kroz tri faze: kotrljanje, čvrsta adhezija i transendotelna migracija. Kotrljanje se odvija pod uticajem endotelnih ćelija koje reaguju na stimulanse citokina u koje se ubrajaju: tumor nekrotični faktor alfa (TNF- α), IL-1 β i IL-17, a nastaju tokom infekcije i upale. Zahvaljujući ovim citokinima dolazi do ekspresije P-, L- i E- selektina na krajevima mikrovila neutrofilnih granulocita (Borregaard, 2010). Adhezivni receptori su pokretači za prelazak neutrofilnih granulocita kroz endotel do mesta infekcije. Ostali receptori vezuju imunoglobuline i komponente komplemanta za plazma membranu neutrofilnih granulocita i omogućavaju im da započnu fagocitnu i baktericidnu funkciju.

2.2.3. Neutrofilne granule

Ceo proces inflamatornog odgovora zavisi od mobilizacije citoplazmatskih granula i sekretornih vezikula neutrofilnih granulocita koji oslobađaju sadržaj granula tokom migracije do žarišta infekcije. Egzocitoza granula i sekretorne vezikule igraju ključnu ulogu u većini funkcija neutrofilnih granulocita od rane aktivacije do uništenja fagocitovanih mikroorganizama (Faurshou i Borregaard, 2003).

Neutrofilni granulociti periferne krvi su okrugle ćelije promera 10 – 20 μm . U citosolu poseduju ravnomerno raspoređene granule, a u sredini se nalazi jedro polimorfnog oblika. Jedro je režnjevito (multilobularno). Ovakva građa im omogućava da režnjeve jedra poređaju linijski i tako obezbede brzu migraciju između endotelnih ćelija. S druge strane, kod makrofaga to nije moguće, jer su makrofagi ćelije koje imaju veliko jedro u obliku potkovice, što znatno otežava migraciju između endotelnih ćelija. Zbog ove karakteristike, neutrofilni granulociti su najvažnije fagocitne ćelije, jer upravo oni najbrže dospevaju na mesto infekcije/zapaljenja (Paape i sar., 2003).

Formiranje granula obeležava prelazak iz mijeloblasta u promijelocit, a sam proces započinje u ranim promijelocitima i nastavlja se kroz različite faze razvoja ovih ćelija. Granule se formiraju tokom mijelopoeze sve do potpunog sazrevanja neutrofilnih granulocita. Elektronskom mikroskopijom je dokazano da u citosolu postoje tri glavne vrste granula koje su bogate enzimima. To su primarne (azurofilne), sekundarne (specifične) i tercijarne (želatinozne) granule i sekretorne vezikule (Borregaard, 2010).

Azurofilne ili primarne granule su prve granule koje se pojavljuju tokom progranulocitne faze granulopoeze. Primarne granule su glavna skladišta hidrolitičkih i baktericidnih proteina kao što su elastaza, mijeloperoksidaza, katepsin G, proteinaza 3 i defenzin. Primarne granule su, prema tome, peroksidaza pozitivne granule. Peroksidaza generiše vodonik-peroksid i u prisustvu halidnih jona uništavaju se bakterije. Defenzini su peptidi bogati cisteinom i argininom, koji ispoljavaju baktericidnu aktivnost prema mnogim gram-pozitivnim, gram-negativnim i anaerobnim bakterijama, gljivicama i virusima (Paape i sar., 2003). U azurofilnim granulama drugih vrsta životinja, nalazi se i lizozim koji je važna baktericidna komponenta (Segal, 2005), ali se u neutrofilnim granulocitima goveda on nalazi u niskoj koncentraciji (Paape i sar., 2003).

Specifične ili sekundarne granule su peroksidaza - negativne granule. One sadrže nezasićeni laktoferin (koji vezuje gvožđe - Fe^{2+} i bakar - Cu^{2+}), kolagenazu, želatinazu, ostatak lizozima i haptoglobin. Oslobađanje laktoferina na mestima infekcije je važno jer ovaj

protein ima visok afinitet za gvožđe i tako ga čini nedostupnim gram-negativnim bakterijama kojima je neophodno za rast. Laktoferin takođe ispoljava efekat negativne povratne sprege na granulopoezu, čime se kontroliše proizvodnja neutrofilnih granulocita tokom akutne infekcije mlečne žlezde (Paape i sar., 2003).

Tercijarne granule se karakterišu visokim sadržajem želatinaze. Osim nje one sadrže arginazu i lizozim. Sekretorne vezikule sadrže proteine citoplazme i služe kao skladišna mesta za receptore i druge membranske proteine.

2.2.4. Funkcije neutrofilnih granula

Proteini iz neutrofilnih granula povećavaju stepen slepljivanja monocita za vaskularni endotel, podstiču makrofage na lučenje citokina i aktiviraju dendritičke ćelije, odnosno stimulišu prezentaciju antigena. Povećanjem koncentracije intracelularnog kalcijuma (Ca^{2+}), granule se prazne odgovarajućim redosledom. Prvo se oslobađa sadržaj sekretornih vezikula, zatim tercijarnih granula, sekundarnih granula i na kraju, primarnih granula (Sengeløv i sar., 1993). Oslobađanje aktivnih supstanci iz pojedinih vrsta granula je različito regulisano jedinstvenim intracelularnim signalnim putanjama. Dokazano je da komponente sekretornih granula snažno reaguju sa endotelom i imunskim ćelijama u krvotoku. Tercijarne granule se prazne tokom migracije neutrofilnih granulocita kroz endotel, dok se sadržaj sekundarnih i primarnih granula prazni kada neutrofilni granulociti dospeju u ekstravaskularni prostor. Time se podržava uklanjanje bakterija antimikrobnim proteinima zbog toga što nastaje hemotaktički gradijent koji privlači druge imunske ćelije i modulira funkcije ćelija prisutnih u zahvaćenom tkivu. Prethodno formirane neutrofilne granule otpuštaju visoke koncentracije rastvorljivih medijatora koji imaju centralnu ulogu u unakrsnoj komunikaciji neutrofilnih granulocita sa ostalim ćelijama imenskog sistema (Soehnlein i sar., 2009).

2.3. Funkcije neutrofilnih granulocita

Dve suštinski najvažnije funkcije neutrofilnih granulocita za eliminaciju mikroorganizama iz organizma su fagocitoza i respiratorni prasak.

2.3.1. Fagocitoza

Fagocitoza predstavlja ćelijski proces u kome „strani“ (engl. „*non-self*“) molekuli bivaju obuhvaćeni od strane dela ćelijske membrane neutrofilnih granulocita. Do aktivacije neutrofilnih granulocita dolazi pod dejstvom stimulatora upale kao što je TNF- α . Stimulatori upale mogu biti fiziološki i nefiziološki (Robinson, 2008). Fiziološki stimulatori upale su fragmenti bakterija ili gljivica, različiti bioaktivni lipidi i antitela. U nefiziološke stimulatore se ubrajaju: masne kiseline, forbol estri i retionoidi. Neutrofilni granulociti na svojoj membrani nose nekoliko familija receptora, a svaka od njih je medijator fagocitoze određene vrste mikroorganizma. Kada se neutrofilni granulocit sretne sa bakterijom, spaja se i okruži je pseudopodama na mestima između opsonina na mikroorganizmu i receptora na svojoj površini. Tokom nastanka fagozoma, dolazi do kompleksnog procesa polimerizacije aktina i remodeliranja plazma mebrane u cilju obuhvatanja patogenog mikroorganizma. Rezultat polimerizacije je proširenje aktinom bogatih pseudopoda što omogućava "gutanje" patogene čestice i formiranje vezikule - fagozoma (Teunissen i sar., 2002). Nakon ingestije, sledi sazrevanje fagozoma koji prolazi kroz tri faze, tako da se razlikuju: rani fagozom, kasni fagozom i fagolizozom, koji predstavlja najaktivniju mikrobicidnu organelu (Flannagan i sar., 2009). U fagolizozomu dolazi do razlaganja stranih materija pod dejstvom hidrolitičkih enzima, uz nizak pH. Iz citoplazmatskih granula neutrofilnih granulocita se oslobađaju lizirajući enzimi i antimikrobni peptidi. Antimikrobni molekuli neutrofilnih granulocita su visoko reaktivni, ali nisu ciljno specifični. Oni su, samim tim, izuzetno opasni po samog domaćina, zbog čega su smešteni u granule i funkcionalni su samo unutar fagolizozoma. Ovo predstavlja vid sopstvene zaštite domaćina. Svaka opsonizovana čestica dospeva u fagozom za 20ak sekundi i njeno uništenje je skoro trenutno (Segal, 2005).

2.3.2. Respiratorni prasak

Respiratorni prasak (engl. *respiratory burst*) podrazumeva proizvodnju ROS (engl. *Reactive Oxygen Species* - reaktivni proizvodi kiseonika) u kombinaciji sa aktivacijom fagocita. U trenutku vezivanja komponenti komplekta i imunoglobulina za površinske

receptore na neutrofilnim granulocitima, ćelija se aktivira i započinje respiratorni prasak, uz povećanu potrošnju kiseonika. Aktivacijom neutrofilnih granulocita, aktivira se i NADPH oksidaza multiproteinski kompleks, pri čemu neutrofilni granulociti povećavaju utrošak kiseonika za skoro 100 puta. Dolazi do pretvaranja nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADP) u NADP⁺, uz otpuštanje elektrona. Molekul kiseonika prima elektron i nastaje superoksidni anjon (O²⁻). Ovaj superoksidni anjon je vrlo nestabilan i dolazi do njegovog spontanog prelaska u H₂O₂. Superoksidni anjon i H₂O₂ predstavljaju dva glavna produkta NADPH oksidaze i nisu dovoljni za efikasan baktericidni učinak, ali pojačavaju dejstvo drugih radikala kiseonika sa izraženim antimikrobnim delovanjem. Da bi mikroorganizam u fagozomu mogao biti uništen, potrebna je izuzetno toksična sredina. U zavisnosti od prisustva različitih substrata i/ili stimulišućih faktora nastaju i drugi reaktivni metaboliti kiseonika: azotni - oksid i peroksinitrat (Fox i sar., 2010). Oni su takođe nestabilni i reaguju sa ostalim kiseoničkim produktima, stvarajući vrlo nepogodnu sredinu po mikroorganizme. Reaktivni kiseonikovi metaboliti i enzimi lizozoma mogu pojedinačno ili u kombinaciji razgraditi većinu mikroorganizama (Tizard, 2000). Njihova proizvodnja je neophodan korak u efikasnom delovanju urođenog imuniteta. Važnost respiratornog praska je postala očigledna još tokom proučavanja sindroma hronične granulomatozne bolesti, kada je uočena veza između povećane prijemčivosti ka bakterijskim i gljivičnim infekcijama, smanjene potrošnje kiseonika i smanjene antimikrobne aktivnosti (Dahlgren i Karlsson, 1999). Na žalost, ROS ne deluju samo protiv mikroorganizama, već uništavaju i “nedužno okruženje”, a time su dobrim delom odgovorni za tkivna oštećenja tokom upalnih procesa (Björkman i sar., 2008).

2.3.2.1. Uloga mijeloperoksidaze

Uz aktivaciju neutrofilnih granulocita i respiratornog praska, istovremeno dolazi i do oslobađanja sadržaja primarnih granula u fagozomu. Mijeloperoksidaza (MPO) čini 5% od svih proteina neutrofilnih granulocita i ona u fagozomu dostiže koncentraciju od čak 100 mg/ml (Segal, 2005). Oslobođena MPO prevodi H₂O₂ u hipohlornu kiselinu. Hipohlorna kiselina je najmoćniji oksidans koji proizvode neutrofilni granulociti u znatnim količinama i ona u velikoj meri doprinosi oštećenjima bakterija (Kettle i sar., 1997). Takođe MPO oksidiše rezidue tirozina kako bi proizvela još jedan citotoksični produkt - radikal tirozina. Ovaj enzim ima hem kao prostetičnu grupu, koja daje zeleni pigment, što se može videti po boji sekreta, kao što su gnoj i sluz, koji sadrže dosta neutrofilnih granulocita. Sve ove međusobne reakcije kulminiraju i dovode do gubitka vitalnosti ingestiranog mikroorganizma, ali i do

degranulacije i oslobađanja antimikrobnih molekula u blizini mesta infekcije. Nakon aktivacije enzima unutar ćelije, ubijanje bakterija potpomažu reaktivne vrste kiseonika proizvedene u procesu respiratornog praska (Burvenich i sar., 1994; Nauseef i Clark, 2000; Andreassen i Roth, 2000).

Smatra se da neutrofilni granulociti doprinose eliminaciji bakterija, pre svega, fagocitozom i intracelularnim ubijanjem, kao i oslobađanjem reaktivnih vrsta kiseonika i antimikrobnih polipeptida (Witter i sar., 2016). Međutim, ekstracelularne koncentracije ovih proteina su često manje od onih koje su potrebne za ubijanje bakterija. Stoga, ekstracelularno oslobođeni antimikrobni polipeptidi mogu doprineti eliminaciji bakterija posrednim mehanizmima. Nedavno je dokazano da antimikrobni peptidi dobijeni od neutrofilnih granulocita doprinose uništavanju bakterija direktnim delovanjem na makrofage (Silva, 2011). Makrofagi i neutrofilni granulociti imaju delimično preklapajuća i komplementarna svojstva, što je povezano sa njihovim zajedničkim poreklom i daljim specijalizovanim diferenciranjem tokom mijelopoese. Kod zapaljenskih/infektivnih žarišta, kao rezultat ekstracelularnih ili intracelularnih patogena, monociti, makrofagi i neutrofilni granulociti formiraju složene, hemotaktičke mreže. Ove mreže nastaju detekcijom patogena pomoću epitelnih i endotelkih ćelija specifičnih za datu lokaciju, pretežno od strane makrofaga smeštenih u okolnim tkivima (Silva, 2011).

2.4. Uloga neutrofilnih granulocita kod infektivnih oboljenja

Kao što je već ranije navedeno, organizam se od patogena brani fizičkim barijerama i kod mlečnih krava na nivou mlečne žlezde i uterusa postoje odbrambeni mehanizmi koji štite od njihovog prodora. Međutim, u uslovima držanja životinja koji nisu optimalni, pri intenzivnoj laktaciji i postojanju metaboličkih oboljenja kod jedinki, patogeni imaju veću šansu da prođu kroz ove barijere. Poznato je da nakon partusa, cerviks postaje mesto prodora patogena u uterus, a određene bolesti kod nekih grla mogu biti i posledica genetske predispozicije. Kod goveda su česta oboljenja (endometritisi, metritisi, mastitisi, mlečna groznica, zaostala posteljica, ketoza, dislokacija sirišta, hromost i sl.) koja dovode do reproduktivnih poremećaja i pojave odložene koncepcije, čime nanose ogromne ekonomske štete. Upravo zbog toga urođeni imunitet je, kod krava, od velikog značaja (Abbas i sar., 1994).

Da bi neutrofilni granulociti ispoljili svoju maksimalnu aktivnost, važno je da je organizam u homeostazi, jer samo tako kaskadna reakcija njihovog aktiviranja i migracije teče po planu. U odbrani od infekcija, urođeni i stečeni imunitet deluju sinergistički kako bi eliminisali patogene i već je istaknuto da neutrofilni granulociti kao efektorske ćelije predstavljaju prvu liniju odbrane. Zbog toga je pravovremeno prepoznavanje samog antigena i aktiviranje neutrofilnih granulocita najbitnije za uspešno uklanjanje patogena. Koliko je bitno da neutrofilni granulociti na vreme stignu na mesto infekcije ukazuje i činjenica da će se, ukoliko “zakasne” samo 1h, broj *E. coli* za to vreme povećati 8 puta. Samim tim, njihov zadatak u uklanjanju mikroorganizma će biti znatno teži, kao i u uklanjanju endotoksina koje su ove bakterije sintetisale (Rainard i Riollet, 2006; Kehrl, 2015).

Nakon aktivacije neutrofilnih granulocita, dolazi do ekspresije proinflamatornih citokina i medijatora koji dalje regulišu imunski odgovor. Ekspresijom E-, P- i L-selektina, neutrofilni granulociti čvršće prijanjanju uz endotelne ćelije i zatim, uz promene na vaskularnom endotelu koje slede, migriraju ka žarištu infekcije. Brža migracija ka žarištu infekcije uslovljava i brže povećanje broja somatskih ćelija. U mleku krava obolelih od mastitisa se, već nakon 12h, značajno povećava broj ćelija, a samim tim dolazi i do smanjenja broja neutrofilnih granulocita u cirkulaciji. Neutrofilni granulociti se usmeravaju ka mlečnoj žlezdi ili uterusu, gde će se dalje odvijati fagocitoza i respiratorni prasak u cilju uništenja mikroorganizma. Neutrofilni granulociti u cirkulaciji su kratkoživeći i podležu apoptozi u roku od 12-18h, dok neutrofilni granulociti u tkivima podležu različitim promenama i tako postaju sposobni da vrše mnogobrojne funkcije, za koje se ranije smatralo da ih isključivo vrše makrofagi (Wright, 2010).

U mlečnoj žlezdi postoji povećana propustljivost - dvosmerna pasaža molekula iz mleka u telo i obrnuto, koja predstavlja vrlo bitan mehanizam urođenog imunskog sistema. Ovaj mehanizam omogućava kako krvnim tako i imunskim komponentama, pre svega neutrofilnim granulocitima, da dođu do lumena mlečne žlezde (Oviedo-Boyso i sar., 2007).

2.4.1. Funkcije hemoatraktanata

Za migraciju neutrofilnih granulocita do mesta infekcije (mlečnu žlezdu ili uterus) neophodni su odgovarajući hemoatraktanti, a svaki od njih ima tačno definisanu ulogu. Za ovaj proces su neophodne komponente sistema komplementa (C3a i C5), TNF- α , IL-1, IL-2 i IL-8. Interleukin 2 stimuliše rast i diferencijaciju B limfocita, aktivira NK ćelije i T-limfocite, pa je razumljivo da promene u sekreciji ovog citokina dovode do smanjene odbrane i razvoja bolesti, kao što je na primer mastitis. Koliko su ovi citokini bitni za funkciju neutrofilnih granulocita u eliminaciji patogena, ukazuje i podatak da se kod *E. coli* infekcija već nakon nekoliko sati od početka infekcije povećava koncentracija IL-1 i TNF- α , kao i hemokina IL-8 u mleku i, posledično, 3-12h kasnije, koncentracija neutrofilnih granulocita u mleku se višestruko poveća i do 10^7 ćelija/ml (Rainard i Riollot, 2006).

Komponentne sistema komplementa koje se sintetišu u hepatocitima, mogu delovati direktno na bakterije ispoljavajući svoje baktericidno dejstvo ili posredno, opsonizacijom bakterija (Sordillo, 2014). Funkcija pojedinih hemoatraktanta se razlikuje kod različitih patogena, čak i kad se radi o bakterijama. Gram-negativne bakterije su osetljive na litičku aktivnost komponenti sistema komplementa, dok gram-pozitivne nisu. Neki sojevi bakterija su razvili sposobnost da izbegnu pojedine odbrambene mehanizme domaćina. Tako, *Staphylococcus aureus* ima sposobnost da blokira C3 komponentu i tako spreči aktivaciju sistema komplementa (Oviedo-Boyso i sar., 2007). Kod infekcije sa *E. coli*, vrlo je bitan IL-1 β koji reguliše hemotaksu, dok je kod infekcije sa *S. aureus* značajan samo u početnim stadijumima infekcije.

Sposobnost nekih bakterija da izmene produkciju citokina može uzrokovati i modifikaciju samog imunskog odgovora domaćina (Oviedo-Boyso i sar., 2007). Kod infekcije sa *S. aureus*, uzročnik se lokalizuje intracelularno i ima sposobnost da zahvati sve tipove ćelija u mlečnoj žlezdi. Tek 24-48h nakon infekcije, dolazi do povećanja broja neutrofilnih granulocita, do maksimalne koncentracije od 10^6 ćelija/ml. Ovaj patogen nagomilava toksine kojima oštećuje ćelijske membrane čime izbegava imunski odgovor, tako da posledično nastaje hronična infekcija (Oviedo-Boyso i sar., 2007; Rainard i Riollot, 2006). Dva meseca nakon infekcije, neutrofili granulociti i dalje predstavljaju dominantne ćelije u mleku. Produžena dijapeza neutrofilnih granulocita prouzrokuje oštećenje parenhima mlečne žlezde, doprinoseći smanjenju produkcije mleka.

2.5. Prekomerno aktiviranje neutrofilnih granulocita

Prekomerno aktivirani neutrofilni granulociti predstavljaju opasnost po samog domaćina. U akutnoj fazi infekcije, oni oslobađaju veliku količinu citokina, što može da dovede do kritičnih oštećenja tkiva i organa (Gabbianelli i sar., 2009). Aktivirani neutrofilni granulociti dovode do oslobađanja ROS, ali i čitavog niza nespecifičnih citotoksičnih komponenti. Prekomerna aktivacija neutrofilnih granulocita rezultira degranulacijom i otpuštanjem ROS u ekstracelularnu okolinu, što posledično dovodi do oštećenja tkiva samog domaćina (Iba i sar., 2013). Bezbedno uklanjanje ovakvih neutrofilnih granulocita je esencijalno za očuvanje imunološke homeostaze i kontrolu zapaljenske reakcije.

Za ceo proces uklanjanja ovakvih ćelija su od velikog značaja proinflamatorni i anti-imunogeni signali, koji omogućavaju prepoznavanje apoptotičnih ćelija. Elastaza, koju otpuštaju neutrofilni granulociti zahvaćeni nekrozom stimuliše “mirujuće” makrofage da luče proinflamatorne citokine (Miles i sar., 2009). Međutim, za zaustavljanje inflamacije nije bitno samo sintetisati antiinflamatorne medijatore, već i ukloniti ćelije zapaljenja zajedno sa ingestiranim mikroorganizmima (Iba i sar., 2013).

Smrt neutrofilnih granulocita se može podeliti na nekrozu, apoptozu, autofagiju i noviji, nedavno opisan oblik smrti neutrofilnih granulocita - netozu.

2.5.1. Nekroza neutrofilnih granulocita

Nekrozu neutrofilnih granulocita karakteriše bubrenje citoplazme, dezorganizacija organela, ruptura plazma membrane i razlaganje jedra. Nekrotične ćelije otpuštaju signale koji su poznati kao molekularni obrasci oštećenja (engl. *damage associated molecular patterns* - DAMP), koje prepoznaju receptori za obrasce patogena i dolazi do povećane sinteze proinflamatornih medijatora. Na kraju nekroze povećava se propustljivost ćelijske membrane što vodi ka dezintegraciji same ćelije (otvorena autoliza), a pri tome dolazi do oslobađanja sadržaja u okolni prostor (Iba i sar., 2013).

2.5.2. Apoptoza neutrofilnih granulocita

Prema navodima iz literature, dokazano je da apoptoza neutrofilnih granulocita igra ključnu ulogu u rešavanju inflamatornog odgovora kod ljudi i kod krava (Paape i sar., 2003). Kod apoptoze dolazi do kondenzacije hromatina, što kasnije vodi ka fragmentaciji jedra i

formiranju apoptotičnih telašaca, koja se sastoje od intaktne plazma membrane i različitih organela. Ova apoptotična telašca fagocituju makrofagi. Ceo proces može ići u dva pravca i postoje unutrašnji i spoljašnji put. Kod unutrašnjeg puta apoptoze, dolazi do stimulacije otpuštanja citohroma C iz mitohondrija u citosol, što posledično dovodi do aktiviranja intracelularne kaspaze odgovorne za cepanje DNK i strukturnih proteina citoplazme. Sa druge strane, spoljašnji put apoptoze se odvija vezivanjem ekstracelularnih liganada, kao što je, na primer, TNF- α za specifične receptore na površini ćelije. Na ovaj način proizvodi se transmembranski signal, kojim će se aktivirati kaspaza sekvenca (Iba i sar., 2013). Apoptoza neutrofilnih granulocita je tačno vremenski regulisana i neutrofilni granulociti uglavnom podležu apoptozi nakon 2-4h od izlaska iz cirkulacije. Međutim, tačno vreme kada će se ona dogoditi zavisi od većeg broja faktora (Fox i sar., 2010).

2.5.3. Autofagocitoza neutrofilnih granulocita

Tokom autofagocitoze dolazi do degradacije sopstvenih komponenti kako bi se obnovile komponente citoplazme. Ovaj proces karakteriše nastanak autofagozoma, krupne vezikule koja sadrži citosol i organele koja se zatim spaja sa lizozomom i razlaže bez oštećenja same ćelije (Iba i sar., 2013).

2.5.4. Netoza neutrofilnih granulocita

Netoza je jedinstveni oblik smrti neutrofilnih granulocita i predstavlja takođe programiranu ćelijsku smrt. Kad dođe do bakterijske, gljivične ili parazitske infekcije, mikrobne komponente kao što su lipopolisaharidi, ROS, uključujući H₂O₂ i druge faktore, dovode do morfoloških promena u neutrofilnom granulocitu. Inicijatori netoze mogu biti i tzv. "heat shock" proteini, kao i RNK i DNK samog domaćina (Brinkmann i Zychlinsky, 2012).

Osnovna uloga netoze je eliminacija mikroorganizma. Zadatak neutrofilnih granulocita je da "ulove" mikroorganizam i spreče njegovo širenje cirkulacijom. U aktivisanim neutrofilnim granulocitima dolazi do oslobađanja velike količine ROS-a koji su se ključni za formiranje ekstracelularnih zamki odnosno mreža (netoza). Iz granula neutrofilnih granulocita se oslobađaju elastaze i MPO i migriraju ka jedru. Elastaza u jedru dovodi do razgradnje povezujućih histona i deluje na omotač jedra. U samom jedru MPO dovodi do intenzivne dekondenzacije hromatina. Dalja obrada histona vodi ka rupturi ćelije.

Najjači stimulan za netozu je forbol-miristol acetat (PMA), koji direktno stimuliše protein - kinazu C, a to posledično dovodi do produkcije ROS (Linden i sar, 2017). Tokom infekcije, ROS imaju dvostruku ulogu: u živim neutrofilnim granulocitima zaduženi su za intrafagozomalno uništavanje mikroorganizama i kao posrednik u njihovom uništavanju *post mortem* netozom. Pored ROS, MPO i elastaze, vrlo je bitan i enzim jedra peptidil arginin deiminaza 4 (PAD4), koji promoviše dezaminaciju histona i na taj način modifikuje aminokiseline, što će dalje omogućiti dekondezaciju hromatina (gubi se pozitivan naboj neophodan za interakciju histona i DNK) (Sørensen i Borregaard, 2016).

Redosled događaja je sledeći:

- nekoliko minuta nakon aktivacije, neutrofilni granulociti se spljošte i dolazi do čvrste adhezije;
- tokom sledećeg sata jedro gubi svoje režnjeve i hromatin se dekondezuje;
- nakon nekoliko sati omotač jedra se dezintegriše u vezikulu i nukleoplazma postaje homogena;
- na kraju, dolazi do rupture ćelijske membrane i unutrašnji sadržaj se oslobađa u ekstracelularni prostor formirajući mreže (engl. *Neutrophil extracellular traps* - NETs) (Fuchs i sar., 2007).

Mreže čine dekondezovani hromatin, sa granulama i citoplazmatskim proteinima. Za razliku od fagocitoze koja zahteva veliki utrošak energije, mreže imaju sposobnost da „ulove“ mikroorganizme bez dodatnog utroška energije. Njihova sposobnost da ulove mikroorganizam je mnogo duža nego sposobnost ćelije da ulove mikroorganizme putem fagocitoze. Mreže mogu da uklone i mikroorganizme koji su krupni i koje neutrofilni granulociti ne mogu da fagocituju (Papayannopoulos i Zychlinsky, 2009).

2.6. Tranzicioni (prelazni) period krava

Tranzicioni ili prelazni period obuhvata kasnu steonost od 3 nedelje pre, pa sve do 3 nedelje posle partusa. Tranzicioni period karakterišu visok nivo stresa i velike promene u čitavom organizmu. Stres je, sa jedne strane, prouzrokovan teljenjem, a sa druge strane, početkom laktacije i povećanim potrebama u energiji i hranljivim materijama kako bi se zadovoljile sve potrebe organizma u ovom novom periodu. Na nivo stresa mogu uticati i

promene u okolini i neodgovarajući menadžment na farmi. Svi navedeni faktori iziskuju od organizma značajne promene u cilju održavanja homeostaze i ovi procesi se označavaju kao homeoreza.

Period zasušenja se smatra periodom “mirovanja” između dve laktacije. Ovaj period je vrlo intenzivan: dolazi do razvoja i rasta ploda, obnove mlečne žlezde i pripreme za novu laktaciju, što uslovljava povećane potrebe za hranljivim materijama. Dolazi do aktiviranja homeoretskih mehanizama koji se karakterišu metaboličkim i fiziološkim adaptacijama organizma. Homeoretski mehanizmi, u odnosu na kratkotrajne homeostatske, predstavljaju dugotrajne promene, koje mogu trajati, satima, danima pa i nedeljama (Pires, 2013).

2.5.1. Hormonalne promene

Partus i početak laktacije dovode do stresa kod krava. On kao dominantan faktor u ovom periodu, dovodi do aktiviranja simpatikusnog nervnog sistema i oslobađanja hormona stresa: glukokortikosteroida, noradrenalina i adrenalina. Koncentracija glukokortikosteroida u krvnoj plazmi se povećava aktivacijom hipotalamo-hipofizno-adrenokortikalne osovine.

Koncentracija glukokortikosteroida raste oko partusa, a poznato je da ovi hormoni imaju imunosupresivno dejstvo (Sordillo, 2014). Glukokortikosteroidi su veoma značajni u peripartalnom periodu kao hormoni koji stimulišu glukoneogenezu. Oni deluju kao katabolički hormoni na metabolizam proteina u cilju povećanja koncentracije aminokiselina u krvi. Aminokiseline zatim odlaze do jetre gde se posle transaminacije i dezaminacije metabolišu i ulaze u proces glukoneogeneze. Koncentracija kortizola se može povećati i nekoliko puta, naročito na dan teljenja (Mordak i Stewart, 2015).

Kortizol je snažan imunosupresivni agens koji dovodi do smanjenja stepena proliferacije leukocita i slabljenja njihovih funkcija, smanjenja fagocitne sposobnosti neutrofilnih granulocita i smanjenja citotoksičnog delovanja limfocita (Mordak i Stewart, 2015). Noradrenalin i adrenalin stimulišu proizvodnju anti-inflamatornih citokina TGF- α (engl. *transforming growth factor α*) i IL-10, koji dovode do imunosupresije, zbog toga što smanjuju stepen sinteze proinflamatornih citokina (IFN- α , TNF- α i IL-12) (Aleri i sar., 2016).

2.6.2. Energetske potrebe krava u tranzicionom periodu

Tokom poslednje tri nedelje steonosti, potrebe u hranljivim materijama placente i samog fetusa su najveće, ali se istovremeno javlja i manji unos hrane (10-30%) nego na početku zasušenja (Drackley i sar., 2005). Glukoza je univerzalni i esencijalni izvor energije i neophodno je da organizmu krave bude uvek dostupna u cirkulaciji u dovoljnim količinama. Tokom kasnog graviditeta, krave se nalaze u stanju pozitivnog energetskeg bilansa i najveći deo glukoze se troši za zadovoljavanje potreba ploda i pripremu za početak laktacije. Zbog prilagođavanja metabolizma ovim intenzivnim promenama nakon partusa dolazi do hipoglikemije koja može biti manje ili više izražena (Quiroz - Rocha i sar., 2012). Iskorišćavanje glukoze iz jetre je dvostruko veće pri kraju graviditeta i to traje sve do druge nedelje posle partusa (Aschenbach i sar., 2010). Partus karakteriše naglo smanjenje apetita usled inhibicije centra za glad i intenziviranja lipomobilizacije, povećanja koncentracije i oksidacije neesterifikovanih masnih kiselina (NEMK) i povećanja aktivnosti Na-K-ATP-aze. Smanjeni apetit nastaje pod dejstvom hormonalnih promena pred teljenje, i to kako hormona hipofize, tako i hormona reproduktivnih organa (insulin, somatotropin, kortizol, estrogen, progesteron i prolaktin) (Adewuyi i sar., 2005).

Resorpcija prekursora za glukoneogenezu iz digestivnog trakta ne može da zadovolji povećane potrebe u glukozi, kako zbog smanjenog apetita i smanjenog unosa suve materije, tako i zbog primarnog metabolizma koji se odigrava u enterocitima, pri čemu zbog ovih reakcija čak 30 -40 % glukoze iz lumena gastrointestinalnog trakta nikad ne stigne do cirkulacije. Kod krava koje proizvode 30 - 40 kg mleka na dan, potrebe u glukozi su oko 3 kg dnevno, dok kod onih koje proizvode do 90 kg mleka dnevno, te potrebe iznose čak 7,4 kg dnevno. Od te količine se 4,4 kg utroši na stvaranje laktoze (Aschenbach i sar., 2010). Nizak nivo glukoze se objašnjava činjenicom da mlečna žlezda utroši 50% do 85% ukupne glukoze u telu, tako da veća proizvodnja mleka uslovljava nižu glikemiju (Bicalho i sar., 2017; Aschenbach i sar., 2010).

Glukoneogeneza, koja se odigrava u jetri, nije dovoljna da zadovolji ove pojačane potrebe mlečne žlezde. Usled hipoglikemije i ubrzane potrošnje rezervi glikogena u jetri, aktivira se povlačenje rezervi iz drugih telesnih depoa i dolazi do smanjenja raspoloživosti glukoze za ostala tkiva. Glukoza je vrlo bitan energetskeg izvor za neutrofilne granulocite, tako da se uz negativni energetskeg bilans javlja i poremećaj funkcija neutrofilnih granulocita. Neophodnu energiju za hemotaksu, fagocitozu i uništavanje mikroorganizama, neutrofilni granulociti obezbeđuju preko egzogene glukoze, s jedne strane, ili preko endogenih rezervi iz

glikogena, s druge strane (Aschenbach i sar., 2010). Galvao i sar. (2010) su utvrdili da smanjene rezervi glikogena u neutrofilnim granulocitima pri teljenju povećava incidencu pojave endometritisa. Kod krava sa subkliničkim endometritisom je utvrđen niži sadržaj glikogena u neutrofilnim granulocitima nego kod zdravih krava.

2.6.3. Poremećaji energetskeg metabolizma krava

2.6.3.1. Lipoliza

U periodu partusa i početka laktacije, energetske potrebe se praktično mogu udvostručiti za jedan dan (Drackley i sar., 2005). Da bi organizam mogao da podrži laktaciju, aktiviraju se adaptivni mehanizmi kako bi se obezbedila dovoljna količina energije potrebne za produkciju mleka. Hormonske promene koje karakterišu partus i početak laktacije podrazumevaju nagli pad koncentracije progesterona, porast koncentracije prolaktina i hormona rasta, čime se favorizuje lipoliza, kao dominantan energetske proces (Contreras i sar., 2017). Citokini i hormoni stresa utiču na pojačanu sekreciju i drugih lipolitičkih hormona: hormona rasta, kateholamina i kortizola. Hormon rasta smanjuje upotrebu aminokiselina u energetske svrhe i povećava unos aminokiselina u ćelije, uz njihov smanjeni katabolizam. Kateholamini se vezuju za adrenergičke β receptore na površini adipocita, aktiviraju adenilat ciklazu i pretvaranje adenozin- trifosfata (ATP) u ciklični adenozin-monofosfat (cAMP), što reguliše dalji tok lipolize. Porast gonadotropnih hormona, kao i noradrenalina, takođe podržava čitav proces mobilizacije masti (Contreras i sar., 2017). Promene u endokrinom sistemu koje nastaju u peripartalnom periodu mogu biti odgovorne i za nastanak nekontrolisane lipomobilizacije, kao i poremećaja energetskeg metabolizma. Mobilizacija masti iz masnih tkiva počinje u poslednjoj nedelji steonosti (Vazquez-Anon i sar. 1994) usled hormonalnih promena koje intenziviraju glukoneogenezu (Vasilatos i Wangnes, 1981, Holtenius i sar., 1993), što rezultira povećanjem koncentracije slobodnih masnih kiselina u krvi pre teljenja (Studer i sar., 1993) sa najvišim vrednostima nakon teljenja (Kovačević i sar., 1999).

2.6.3.2. Negativni energetska bilans

Ranu fazu laktacije, uz hormonske poremećaje i unos suve materije koji još uvek nije dostigao maksimum, prati negativan energetska bilans (NEB). On je najizraženiji 2-3 nedelje nakon partusa i zatim se vraća na nulti nivo za oko 8-10 nedelja posle teljenja (Thatcher i sar., 2010).

Period rane laktacije prati i nagli pad koncentracije insulina, što predstavlja jedan od homeoretskih mehanizama pri kome razvojem insulinske rezistencije dolazi do usmeravanja svih rezervi glukoze ka mlečnoj žlezdi i smanjene osetljivosti miocita, adipocita i hepatocita na insulin. Na ovaj način se raspoloživa energija usmerava na proizvodnju mleka. Smanjenjem koncentracije insulina dolazi do prevage lipolize nad lipogenezom. Međutim, ukoliko nakon teljenja koncentracija insulina padne ispod donje fiziološke granice za ovaj period, proces lipolize se znatno intenzivira. To uslovljava da se koncentracija NEMK u krvi poveća iznad gornje fiziološke granice.

Poznato je da je plodnost krava je pod uticajem energetskog bilansa i zdravstvenog stanja već 2-3 meseca pre perioda osemenjavanja. Krave sa velikim smanjenjem telesne mase (više od 0,5 OTK u ranoj laktaciji), imaju produženo trajanje estrusa, odnosno veći broj dana do ovulacije i znatno smanjen procenat koncepcije u prva tri osemenjavanja (Smith i sar., 1983, Otto-a i sar., 1991; Senatore i sar., 1996).

2.6.3.2.1. Neesterifikovane masne kiseline

Neesterifikovane masne kiseline, koje su nakon lipolize dospele u masno tkivo, hormoni štitne žlezde usmeravaju u hepatocite gde podležu potpunoj oksidaciji. Nakon teljenja ovaj proces je kompromitovan, jer razvojem insulinske rezistencije dolazi do pada njihove koncentracije i pojačavanja procesa reesterifikacije masnih kiselina i sinteze triglicerida u hepatocitima. Međutim, ukoliko koncentracija tireoidnih hormona padne ispod fizioloških vrednosti karakterističnih za taj period, zbog metaboličke neravnoteže i ograničenog kapaciteta jetre za oksidaciju masnih kiselina, dolazi do njihovog nakupljanja u hepatocitima u obliku triglicerida i pojave masne jetre (Nikolić i sar., 2003, Van Knegsel i sar., 2007). Ovi hormoni su zaduženi i za resorpciju glukoze u crevima i stimulaciju glukoneogeneze i glikolize u ćelijama jetre. Smanjenje njihove koncentracije nakon teljenja, uslovljava inhibiciju ovih procesa. Nakon teljenja, pankreas smanjuje proizvodnju insulina što rezultira smanjenom upotrebom glukoze u organima osetljivim na insulin. S obzirom da i

insulin i glukoza predstavljaju faktore u regulaciji koncentracije glukagona kod muznih krava, kao odgovor na smanjenje koncentracije glukoze u serumu, pojačava se lipoliza i oslobađaju se NEMK (Fiore i sar., 2017).

Sa porastom koncentracije NEMK u krvi, najveći deo ovih kiselina se nagomilava u jetri, gde može doći do njihove potpune ili delimične oksidacije ili resinteze do triglicerida (Drackley i sar., 2005; Ingvarlsen i Moyes, 2015). Potpuna oksidacija podrazumeva reakcije u sklopu Krebsovog ciklusa, kada se NEMK u potpunosti oksidišu do CO₂. Delimičnom oksidacijom nastaju ketonska tela koja se otpuštaju u krvotok i predstavljaju izvor energije drugim tkivima. Posle resinteze u trigliceride, oni manjim delom izlaze iz jetre preko lipoproteina male gustine, a većim delom se akumuliraju u jetri. U vreme rane laktacije kod približno 50% krava dolazi do akumulacije triglicerida u jetri (Ingvarlsen i Moyes, 2015). Povećane koncentracije NEMK u plazmi tokom rane laktacije, mogu biti korisne za životinje da makimalno povećavaju sintezu mleka uz smanjenu potrošnju glukoze. Međutim, porast koncentracije hormona rasta i nizak nivo insulina u krvotoku tokom ovog perioda, značajno stimuliše mobilizaciju iz masnih tkiva, što potvrđuje povećanje nivoa NEMK u krvnoj plazmi (Piccione i sar., 2012).

2.6.3.2.2. Beta-hidroksi-butirat

Beta-hidroksi-butirat (BHB) i NEMK predstavljaju osnovne pokazatelje negativnog energetskeg bilansa tokom prelaznog perioda (McCarthy i sar., 2015). Koncentracije NEMK i BHB su pokazatelji stepena mobilizacije masti i oksidacije masnih kiselina (Bauman i Currie, 1980; Wathes, 2012). U ranoj laktaciji, dolazi do nagomilavanja i povećanja koncentracije β-hidroksi butirata, acetona i acetoacetata, kao intermedijarnih produkata nepotpune oksidacije NEMK do acetyl-CoA. Uz značajno povećanje koncentracije BHB u ranoj laktaciji, uočavaju se i promene u koncentraciji masnih kiselina, glukoze, holesterola, uree, kalcijuma i fosfora (Quiroz-Rocha i sar., 2012). Hayirli i sar. (2011) su uočili uticaj ishrane na vrednosti BHB i utvrdili da je porast BHB veći kod krava koje su bile na *ad libitum* režimu ishrane, sa približavanjem partusa, nego kod onih koje su bile na ograničenom režimu ishrane (-30%). Nakon partusa, kako je laktacija odmicala, kod oba tipa ishrane je zapažen sličan pad u koncentraciji BHB do fizioloških vrednosti. Dokazano je da su koncentracije BHB koje prelaze vrednosti od od 1,1 i 1,6 mmol/l, tokom prve 2 nedelje nakon teljenja, povezane sa smanjenom koncepcijom i povećanim rizikom za isključenjem grla iz proizvodnje. Vrednosti

BHB u serumu od 1,4 i 1,2 mmol/l tokom prve i druge nedelje nakon teljenja su povezane i sa značajnim gubicima mleka (1,5 do 2,4 kg dnevno) (Fiore i sar., 2017).

2.6.3.3. Promene u potrebama za mineralnim materijama

Tranzicioni period karakterišu intenzivne promene u koncentraciji Ca^{2+} u serumu. Nakon teljenja, velike količine Ca^{2+} su potrebne za sintezu i sekreciju kolostruma i mleka. Kao odgovor na povećane zahteve u Ca^{2+} od strane mlečne žlezde, njegove rezerve u plazmi se višestruko smanjuju. Koncentracija Ca^{2+} u serumu mlečnih krava opada na dan samog partusa ili u prvim danima nakon teljenja (Piccione i sar., 2012, Quiroz- Rocha i sar., 2009, Drackley, 2005), a zatim ispoljava trend rasta tokom laktacije. Hernandez-Castellano i sar. (2017) su uočili minimalne vrednosti prvog dana nakon teljenja, dok već od 3. dana nakon teljenja dolazi do normalizacije koncentracije Ca^{2+} u serumu.

Pravovremena aktivacija homeostatskih mehanizama je od velikog značaja za nadoknadu visoke potrošnje Ca^{2+} (Martinez i sar., 2012). Kada se Ca^{2+} oslobodi iz endoplazmatskog retikuluma (ER), receptori ER šalju signal plazma membrani, otvaraju se kanali za kalcijum i dolazi do retrogradnog procesa. To omogućava da dodatni Ca^{2+} pređe iz ekstracelularnog prostora i tako omogući dopunu rezerve Ca^{2+} u ER. Kod hipokalcemije, ovi adaptivni mehanizmi ne mogu u potpunosti da ostvare svoj potencijal. Da bi se povećala koncentracija kalcijuma u citosolu, potrebno je dopuniti rezervne vrednosti u ER, što nije moguće zbog smanjene koncentracije Ca^{2+} u krvi. Kod krava sa hipokalcemijom, u prve 3 nedelje nakon teljenja, sa opadanjem koncentracije Ca^{2+} u serumu, verovatnoća za pojavu endometritisa raste. U studiji koju su sproveli Martinez i sar. (2012) utvrđeno je da svako povećanje koncentracije serumskog Ca^{2+} za svega 0,125 mmol/l smanjuje šanse za pojavu endometritisa za čak 22%. U ovoj studiji je utvrđeno da je rizik u populaciji krava za nastanak oboljenja uterusa (66% za metritis i čak 91,3 % za puerperalni endometritis) posledica supkliničke hipokalcemije. Krave u hipokalcemiji su takođe podložnije pojavi dislokacije sirišta, ketoze i prolapsusa materice, upravo zbog slabijih kontrakcija glatke muskulature. Van Saun (2016) ističe da postoji povećan rizik za nastanak postpartalnih oboljenja kod krava kod kojih su vrednosti Ca^{2+} pre ili posle partusa ispod 2,0 mmol/l, što ukazuje na moguću ulogu kalcijuma u funkcijama imunskih ćelija.

Prolazno smanjenje koncentracije Ca^{2+} u serumu, sa uobičajenih 2,75 mmol/l na 1,75 mmol/l (takozvana fiziološka hipokalcemija) prati smanjenje sadržaja fosfora, dok se sadržaj Mg nešto poveća (Jazbec, 1990). Pad koncentracije kalcijuma i fosfora u serumu krava tokom

rane laktacije ukazuje na njihovo intenzivno iskorišćavanje od strane mlečne žlezde (Krsmanović i sar., 2015).

Tokom kasnog graviditeta, količina fosfora u plazmi može naglo opasti, jer se povlače značajne količine fosfora iz cirkulacije majke za intenzivan rast fetusa. Početak laktacije, proizvodnja kolostruma i mleka preuzimaju velike količine fosfora iz ekstracelularnih rezervi, što uzrokuje akutnu hipofasfatemiju. Ukoliko se kod životinje istovremeno razvije i hipokalcemija, dolazi do porasta koncentracije paratiroidnog hormona i usled njegovog uticaja na metabolizam fosfora još više se smanjuje nivo fosfora, jer se povećava njegovo izlučivanje urinom i putem pljuvačke (Goff, 2000). Za svaki litar kolostruma utroši se 0,8-1,9 g fosfora (Krsmanović i sar, 2015). Za proizvodnju svakog kg mleka utroši se oko 1 g fosfora iz ekstracelularnih rezervi. U periodu oko teljenja, nastupa i staza rumena koja može "zarobiti" fosfat u buragu, pa je tako i njegova ponovna resorpcija u crevima za obnovu rezervi fosfora u krvi onemogućena (Goff, 2006).

Magnezijum je važan mineral koji je uključen u homeostazu Ca^{2+} i smanjenje koncentracije magnezijuma može dovesti do hipokalcemije (Martinez i sar., 2012). Nedostatak magnezijuma u hranivu muznih krava inhibira sintezu i sekreciju paratiroidnog hormona, smanjuje resorpciju kalcijuma i neorganskog fosfora u digestivnom traktu i inhibira proizvodnju aktivne forme vitamina D (Đoković i sar., 2014). Za razliku od deficita Ca^{2+} , kod kojeg je moguće nadomestiti deficit resorpcijom iz kostiju, za nadoknadu Mg ta mogućnost ne postoji. Održavanje normalnih vrednosti Mg^{2+} u plazmi zavisi isključivo od unosa Mg hranivima. Krave koje imaju nizak nivo Mg^{2+} (0,5- 0,8 mmol/l) imaju očigledne kliničke simptome. Ovakve jedinke sporije unose hranu i uočava se smanjenje proizvodnje mleka (Goff, 2006).

Magnezijum je odgovoran za aktivaciju više od 300 enzima. Kao kompleks Mg-ATP, magnezijum je neophodan za većinu biosintetskih procesa kao što su glikoliza, formiranje cAMP-a i dr. On je uključen u održavanje električnog potencijala membrane (nervnih i mišićnih membrana) i prenos nervnih impulsa (Kahn i Line, 2005). Tokom puerperijuma, nizak nivo kalcijuma i magnezijuma kod muznih krava doprinosi nedovoljnoj proizvodnji insulina. Tako dolazi do poremećaja u metabolizmu organskih hranljivih materija i do predispozicije za nastanak ketoze i masne jetre (Goff i Horst, 1997).

2.6.3.4. Ostale metaboličke promene u peripartalnom periodu

Narušavanjem funkcije jetre u peripartalnom periodu, dolazi do usporene sinteze proteina, verovatno zbog kompeticije za supstrat (Zhou i sar., 2016; Trevisi i Minuti, 2017). Poremećaj funkcija jetre se odnosi na smanjenje sinteze specifičnih proteina akutne faze (negativni reaktanti akutne faze), pre svega albumina, koji su bitni za održavanje metaboličkog integriteta. Smanjeni unos hrane, uz smanjeno iskorišćavanje hranljivih materija i povećanu mobilizaciju telesnih rezervi, kao i pad koncentracije albumina nakon teljenja, rezultira zdravstvenim problemima (Bertoni i sar., 2008; Bionaz i sar., 2007; Trevisi i sar., 2012; Trevisi i sar., 2014). Kod krava, koje su se tek otelile, niske vrednosti albumina dovode do neadekvatnog odgovora na antigen i povećava se mogućnost razvoja endometritisa, mastitisa i drugih bolesti (Nazhat i sar., 2018). Tokom laktacije, mlečna žlezda koristi velike količine proteina za produkciju mleka, zbog čega nastaju razlike u ukupnom sadržaju proteina u krvi u poređenju sa kasnom gestacijom (Bell i sar., 2000; Roubies i sar., 2006; Mohri i sar., 2007). Za procenu proteinskog statusa potrebno je praćenje većeg broja parametara: koncentracije ukupnih proteina, uree, kreatinina, albumina i aktivnosti kreatin kinaze (Puppel i Kuczynska, 2016; Nazhat i sar., 2018).

Period oko teljenja i početka laktacije karakteriše smanjenje apetita, pa dolazi do promena u iskorišćavanju uree u rumenu i posledičnog smanjenja njene resorpcije. Ovo uslovljava i pad koncentracije uree u serumu tokom postpartalnog perioda (Quiroz- Rocha i sar., 2012).

Veći broj autora je proučavao uticaj ishrane na promene koncentracije uree oko partusa i tokom laktacije (Laven i sar., 2007; Graugnard i sar., 2012; Piccione i sar., 2012). Graugnard i sar. (2012) su uočili niže koncentracije uree pre partusa kod krava hranjenih energetski bogatijim hranivom (150% u odnosu na zahteve muznih krava u tom periodu), u odnosu na grupu krava hranjenu energetski slabijim hranivom. Nakon teljenja, hormonalne promene uz povećanje koncentracije insulina kod prekomerno hranjene grupe krava, dalje dovode do smanjenja katabolizma mišićnih proteina i povećanog iskorišćavanja aminokiselina. Ove krave su resorbovale veće količine aminokiselina, ali se zbog veće upotrebe i iskorišćavanja aminokiselina od strane skeletnih mišića, javila manja koncentracija uree.

Prema Rosenberger-u (1979), vrednosti za bilirubin do 8,55 $\mu\text{mol/l}$ su odraz poremećaja funkcije jetre ili hemolitičkog procesa, dok vrednosti iznad 8,55 $\mu\text{mol/l}$ uvek ukazuju na patološke procese u jetri (Đoković i sar., 2009). Povišene vrednosti bilirubina su

posledica smanjenog klirensa bilirubina usled preopterećenja jetre koja je glavni organ za njegov metabolizam (Tennant, 1997; Bobe, 2004). Albumini predstavljaju jedan od indikatora očuvanosti funkcije jetre i pad vrednosti albumina za 20% ukazuje na hronično oboljenje jetre (Sevinc i sar., 2003). Ukoliko dođe do degeneracije ćelija jetre javljaju se i promene u koncentraciji bilirubina. Razlike se uočavaju i pre i posle teljenja. Nakon teljenja se uočava negativna korelacija između vrednosti albumina i bilirubina (Prodanović i sar., 2013). U istraživanju Đokovića i sar. (2009), značajno veće vrednosti bilirubina su utvrđene u toku rane laktacije kod muznih krava u odnosu na vrednosti pre teljenja i u kasnoj laktaciji. Ovakvi rezultati ukazuju na poremećaj ekskretorne funkcije ćelija jetre usled akumulacije masti u hepatocitima nakon teljenja. Negativni energetske bilans koji se javlja u tranzicionom periodu karakteriše pojava supkliničke i kliničke ketoze, koju takođe prati povišen nivo bilirubina, ali i povišena aktivnost enzima aspartat aminotransferaze (AST) (Sakowsky i sar., 2012; Issi i sar., 2016). Povišenje vrednosti ukupnog bilirubina i pojačana aktivnost enzima AST ukazuju na povećanu aktivnost i oštećenje hepatocita usled nakupljanja masti u njima (Horvat i Jovanović, 1999). Oštećenje jetre zbog NEB koji nastaje u ovom periodu dovodi i do smanjene aktivnosti enzima alanin aminotransferaze (ALT) u kasnoj gestaciji i ranoj fazi laktacije (Sakowsky i sar., 2012; Radkowska i Herbut, 2014).

2.7. Uticaj metaboličkih i endokrinih promena na funkcionalnu aktivnost neutrofilnih granulocita

Aktivnost ćelija imunskog sistema može da bude kompromitovana nizom metaboličkih i endogenih promena koje karakterišu tranzicioni period. Postoje brojne studije u kojima su autori pokušali da objasne pojavu prirodne imunosupresije koja može da nastane tokom tranzicionog peioda (Madsen i sar., 2002; Sordillo i Aitken, 2009; Ingvarstsen i Moyes, 2013). Metabolički zahtevi koji prate period kasne steonosti, teljenje i početak laktacije dovode do poremećaja funkcija neutrofilnih granulocita, funkcija limfocita, sinteze antitela, produkcije citokina, kao i do povećane produkcije ROS. Kod zdravih krava, funkcije neutrofilnih granulocita slabe postepeno, sa približavanjem termina teljenja (Paape i sar., 1992; Gilbert i sar., 1993; Moreira da Silva i sar., 1998; Moya i sar., 2008; McDougall i sar., 2017). Prema navodima ovih autora, slabljenje funkcija neutrofilnih granulocita je najizraženije neposredno nakon teljenja i zadržava se na tom nivou tokom prve dve nedelje nakon teljenja, a zatim opet postepeno dolazi do poboljšanja tokom 6 nedelja postpartalno. Funkcija neutrofilnih granulocita ostaje konstantna i visoka tokom celokupnog peripartalnog

perioda, bez obzira da li se radilo o zdravim kravama (Kehrli i sar., 1989b; Hoedemaker i sar., 1992; Zerbe i sar., 1996; Mateus i sar., 2002; Milovanović, 2014) ili kravama sa puerperalnim metritisom (Cai i sar., 1994). Glavni endogeni faktori koji imaju snažan uticaj na funkcionalnu aktivnost neutrofilnih granulocita u tranzicionom periodu su nivo kalcijuma, NEMK i BHB (Galvao i Santos, 2014). Promene nivoa NEMK, BHB i glukoze prate negativni energetske bilans. S obzirom da je glukoza začajnoenergetsko gorivo leukocita, tokom perioda negativnog energetske bilansa kod mlečnih krava se javlja slabljenje funkcija neutrofilnih granulocita, uključujući smanjeni kapacitet ubijanja (Gilbert et al., 1993; Cai i sar., 1994; Pithon-Curi i sar., 2004). Različita tkiva mogu da koriste BHB, u cilju štednje glukoze, kao izvor energije (Holtenius, 1996). Na funkcionalnu aktivnost neutrofilnih granulocita uticaj može imati i promena u koncentraciji uree (Kaufmann i sar., 2010; Senosy i sar., 2012; Nazhat i sar., 2018).

2.7.1. Negativni energetske bilans

2.7.1.1. Glukoza i funkcionalna aktivnost neutrofilnih granulocita

Dosadašnja istraživanja su ukazala da NEB dovodi do imunosupresije i predstavlja jedan od faktora koji učestvuju u slabljenju funkcija neutrofilnih granulocita. Poremećaj njihove funkcije podrazumeva oslabljenu hemotaksu i sporiju migraciju do mesta infekcije (Kehrli i sar., 1989; Sartorelli i sar., 1999; Sartorelli i sar., 2000; Zerbe i sar., 2000). Tokom perioda NEB, kod mlečnih grla dolazi do hipoglikemije, a ovo dovodi do slabljenja funkcije neutrofilnih granulocita, jer je glukoza za njih najvažniji izvor energije (Ingvarsen i Moyes, 2015). Granulociti u velikoj meri zavise od preuzimanja egzogene glukoze, kao i od intracelularnih rezervi, jer ove ćelije na taj način obezbeđuju energiju potrebnu za hemotaksu, fagocitozu i uništavanje mikroorganizama (Bicalho i sar., 2016). Smanjenje rezervi glikogena u neutrofilnim granulocitima je faktor rizika za razvoj oboljenja materice (Galvao i Santos, 2014). Dobro je poznato da izražen NEB u peripartalnom periodu povećava rizik za nastanak postpartalnih bolesti kao što su: zaostala posteljica, mlečna groznica, metritis, mastitis, klinička ketoza i dislokacija sirišta (Fiore i sar., 2017). Kod krava sa subkliničkim endometritisom je uočen niži sadržaj glikogena u neutrofilnim granulocitima, u odnosu na zdrave krave. Smanjenje rezervi glikogena ograničava aktivnost NADPH oksidaza multiproteinskog kompleksa. Aktivnošću NADPH oksidaze nastaje superoksidni jon, koji se

upumpava u fagocitnu vakuolu i omogućava uništavanje mikroorganizama. Od odgovarajuće proizvodnje superoksidnog jona zavisi i sposobnost neutrofilnih granulocita da redukuju citohrom C reduktazu. U stanju NEB nakon teljenja, pokretljivost leukocita kao i sposobnost produkcije superoksidnog anjona su smanjeni (Suriyasathaporn i sar., 2000), a samim tim je smanjena i sposobnost uništavanja invadirajućih mikroorganizma. Negativni energetski bilans dovodi do smanjene produkcije ROS, a samim tim i do smanjene fagocitne sposobnosti neutrofilnih granulocita (Scalia i sar., 2006; Ster i sar., 2012).

Da je glukoza neophodna za funkciju neutrofilnih granulocita, ukazuju istraživanja koja su sprovedi Graugnard i sar. (2012). Ovi autori su kod grupe krava koje su hranjene energetski bogatijim hranivima pre teljenja, uočili veću koncentraciju glukoze, kako pre, tako i posle teljenja, a zapazili su i stimulaciju fagocitne sposobnosti neutrofilnih granulocita.

2.7.1.2. Uticaj promena u koncentraciji neesterifikovanih masnih kiselina i β -hidroksibutirata na funkcionalnu aktivnost neutrofilnih granulocita

Jedan od glavnih faktora za nastanak masne jetre je visok nivo NEMK, a njena pojava utiče negativno na funkcije ćelija imunološkog sistema (Breukink and Wensing, 1997). Nagomilavanje triglicerida u jetri je povezano sa poremećajem, ne samo funkcionalnih, već i fenotipskih karakteristika neutrofilnih granulocita (Zerbe i sar., 2000). Ove kiseline direktno utiču na aktivnost neutrofilnih granulocita tako što narušavaju oksidativni prask, dok BHB više ispoljava negativno dejstvo na fagocitnu sposobnost neutrofilnih granulocita i to u koncentraciji od $\leq 1,5$ mmol/l. Znatno veće koncentracije NEMK dovode do inhibicije respiratornog praska, smanjenja stepena blastogeneze limfocita i smanjene sinteze IgM. Neesterifikovane masne kiseline i BHB se mogu koristiti kao biomarkeri tokom monitoringa reproduktivnih bolesti i to: NEMK pre partusa, a BHB nakon njega (LeBlanc, 2010). Iako se BHB najčešće koristi kao marker za ketozu, Hammon i sar. (2006) su uočili da su krave koje imaju visok nivo BHB podložnije pojavi mastitisa. Drugi autori, povišene koncentracije NEMK, kao odraz NEB pre i nakon partusa, povezuju sa povećanom incidencom različitih reproduktivnih oboljenja usled smanjene odbrambene funkcije neutrofilnih granulocita (LeBlanc, 2010; Chapinal i sar., 2011; Contreras i Sordillo, 2011).

U pozitivnoj korelaciji sa povećanjem koncentracije NEMK je i povišeni nivo haptoglobina - proteina akutne faze koji je značajan za imunski odgovor. Prepoznavanjem patogena oslobađaju se TNF- α i IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 i azotni-oksidi, koji potpomažu dalju migraciju neutrofilnih granulocita i drugih imunskih ćelija i stimulišu sekreciju haptoglobina.

Njegova koncentracije se u periodu neposredno pred partus do prve nedelje nakon partusa kreće od 4,5 - 5 mg/ml (Schulz i sar., 2015).

Koncentracija NEMK utiče i na aktivnost MPO. Jedan od načina procene odbrambene sposobnosti neutrofilnih granulocita je i aktivnost MPO (Quade i sar., 1997; Palić i sar., 2005) i citohrom C reduktaze (Roth i sar., 2001). Promena aktivnosti citohrom C reduktaze se zapaža samo kod krava sa endometritisom, dok je kod zdravih jedinki i jedinki sa subkliničkim formama nema. Mijeloperoksidaza čini 25% svih proteina granula neutrofilnih granulocita i u fagocitnoj vakuoli dostiže koncentraciju od 100 mg/ml (Segal, 2005). Osnovna uloga MPO je u stvaranju H_2O_2 , neophodnog za formiranje ekstracelularnih mreža neutrofilnih granulocita (Borregaard, 2010). Kod zdravih krava, aktivnost MPO umereno opada pred partus, dok se kod krava koje imaju klinički endometritis ili subklinički endometritis uočava izražen pad aktivnosti MPO. Kod krava sa zaostalom posteljicom uočena je smanjena migracija neutrofilnih granulocita i smanjena aktivnost MPO. Ovo zapažanje potkrepljuje i činjenica da smanjeni unos suve materije nakon teljenja dovodi do negativnog energetskog bilansa i povećanja koncentracije NEMK u krvnoj plazmi. Koncentracija NEMK je u negativnoj korelaciji sa MPO, pa posledično nastaje i smanjenje njene aktivnosti.

Iako većina autora povezuje NEB i povišene koncentracije NEMK i BHB sa smanjenom funkcijom imunskog sistema, Martinez i sar. (2012) nisu ustanovili da su kod muznih krava, kod kojih je dijagnostikovano endometritis, bile povećane koncentracije NEMK niti BHB. Ovo ukazuje da postoje i drugi faktori koji mogu uticati na funkcionalnu aktivnost neutrofilnih granulocita. Prema Suriyasathaporn i sar. (2000) je ključna dužina trajanja NEB. Ovi autori su ustanovili da ukoliko NEB kratko traje, uticaj na hemotaksu leukocita nije izražen. Uticaj NEB na funkcije neutrofilnih granulocita zavisi od stepena promena u koncentraciji NEMK i BHB. Proučavajući uticaj različitih koncentracija NEMK na fagocitozu i respiratorni prasak, Scalia i sar. (2006) su ustanovili da ne postoji uticaj NEMK na fagocitnu sposobnost neutrofilnih granulocita. Međutim, koncentracije NEMK koje su odraz umerene lipomobilizacije (do 0,05 mmol/l), inhibiraju respiratorni prasak neutrofilnih granulocita. Nasuprot tome visoke koncentracije NEMK, koje su odraz intenzivne lipomobilizacije (2 mmol/l), povećavaju intenzitet respiratornog praska. Ster i sar. (2012) su takođe utvrdili inhibitorno dejstvo NEMK na respiratorni prasak.

Kaufmann i sar. (2010) navode da do promena u funkciji i proliferaciji ćelija dovodi povećanje koncentracije BHB iznad vrednosti od 1,0 mmol/l. Koncentracije veće od 1,6 mmol/l utiču na poremećaj diferencijacije leukocita. Suriyasathaporn i sar. (2000) su, proučavajući hemotaksu leukocita, ustanovili da u uslovima hiperketonemije dolazi do

smanjenja broja leukocita koji postaju sitniji i imaju manju sposobnost adhezije. Moguće objašnjenje leži u činjenici da su ketonska tela organski molekuli i da mogu ometati vezivanje medijatora zapaljenske reakcije na površini leukocita i tako uticati na slabiju adheziju ćelija. Hoeben i sar. (1997) su utvrdili da povišene koncentracije BHB (1 - 2,5 mmol/l) inhibiraju respiratorni prasak. Nasuprot ovim rezultatima, Elbim i Lizard (2009) nisu utvrdili uticaj BHB na respiratorni prasak neutrofilnih granulocita u koncentracijama od 1 do 10 mmol/l.

2.7.2. Uticaj promena koncentracije kalcijuma u serumu na funkcionalnu aktivnost neutrofilnih granulocita

Serumski kalcijum (Ca^{2+}) ima značajnu ulogu u odbrani organizma od infekcija. Joni kalcijuma su "glasnik" koji kontroliše mnogobrojne procese u ćelijama imunološkog sistema, uključujući hemotaksu, adheziju i izlučivanje pro- i anti-inflamatornih citokina. Oni su odgovorni za proces fagocitoze, omogućavaju ingestiju stranih čestica i takođe kontrolišu dalje korake u sazrevanju fagozoma (Nunes i Demaroux, 2010). Sa teljenjem i početkom laktacije dolazi do pojave supkliničke hipokalcemije usled izlučivanja velikih koncentracija Ca^{2+} preko kolostruma. U literaturi postoje različiti navodi o vrednostima koncentracije kalcijuma tokom supkliničke hipokalcemije. Goff (2008) navodi koncentracije od 2,125 do 2,5 mmol/l kao vrednosti za hipokalcemiju, dok Chapinal i sar. (2012) hipokalcemičnim smatraju vrednosti koje su manje od 2,2 mmol/l. Funkcije neutrofilnih granulocita kod krava sa supkliničkom hipokalcemijom su kompromitovane smanjenjem citosolnog Ca^{2+} potrebnog za iniciranje fagocitoze, iako ovaj proces nije isključivo Ca^{2+} zavisian (Kimura i sar., 2006). Promene u koncentraciji citosolnog Ca^{2+} utiču na aktivaciju neutrofilnih granulocita i stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika, što se može odraziti u smanjenoj fagocitozi i aktivnostima uništavanja patogena (Martinez i sar., 2012). Za efikasno uništenje fagocitovanog patogena neophodna je odgovarajuća količina citosolnog Ca^{2+} . Vezivanjem inflamatornih medijatora i posledično, aktivacijom citosolnih komponenti (fosfolipaza C, protein kinaza C, inozitol-1,4,5- trifosfat), oslobađa se Ca^{2+} iz ER, u cilju povećanja citosolnog Ca^{2+} i do 10 puta u odnosu na bazalne vrednosti (Galvao i Santos, 2014). Za vreme baktericidne aktivnosti, Ca^{2+} ima ulogu u kontroli fuzije sekundarnih granula sa fagozomom. On je sekundarni glasnik u aktivaciji neutrofilnih granulocita i sinhronizaciji oslobađanja sadržaja njihovih granula, koji ima centralnu ulogu tokom ranog odgovora na inflamaciju. Pri kontaktu sa endotelom, prvo se oslobađaju sekundarne granule, a zatim se pri prodoru kroz

endotel oslobađaju tercijarne granule. Na kraju se oslobađa sadržaj primarnih granula prodorom u ekstravaskularne prostore. Ovim kaskadnim reakcijama, neutrofilni granulociti omogućavaju eliminaciju bakterija uz pomoć antimikrobnih proteina, stvarajući hemotaktički gradijent, kojim se privlače i druge ćelije imunskog sistema i moduliraju funkcije ćelija u tkivima (Soehnlein i sar., 2009). Ukoliko ne postoji dovoljna količina Ca^{2+} , ovi procesi nisu mogući, tako da će odbrana organizma i uništavanje fagocitovanih mikroorganizama biti kompromitovani.

Hipokalcemija može da poveća koncentraciju kortizola u krvi (Martinez i sar., 2012), što narušava hemotaksu i baktericidnu aktivnost neutrofilnih granulocita (Salak-Johnson i McGlone, 2007).

2.7.3. Uticaj uree na funkcionalnu aktivnost neutrofilnih granulocita

Uticaj uree na funkciju prve linije odbrane organizma se može objasniti uticajem na funkciju jetre. Poznato je da od koncentracije uree zavise akumulacija masti i poremećaji glukoneogeneze (Drackley i sar. 2001). Takođe, niža koncentracija uree može uticati na smanjenje sposobnosti jetre da pretvara propionat u glukozu (Overton i sar., 1999).

Koncentracija uree zavisi i od tipa ishrane. Povećane količine amonijaka koje nastaju pri unosu većih količina rastvorljivih proteina, utiču na njegovu povećanu resorpciju preko zida rumena i uslovljavaju pojačanu detoksikaciju u jetri. U jetri se amonijak detoksikuje u ureu, pa posledično raste koncentracija uree u krvi i u mleku, što utiče na promenu produkcije ROS i to u smeru intenziviranja. Povećana količina amonijaka utiče na povećanje koncentracije citokina (TNF- α i IL-8), koji dalje dovode do intenziviranja proizvodnje ROS (Tsunoda i sar., 2017). Vezu između funkcije prve linije odbrane i koncentracije uree u serumu potvrđuju rezultati brojnih istraživanja. Nazhat i sar. (2018) su ustanovili negativnu korelaciju između koncentracije uree i procenta polimorfonuklearnih leukocita nakon teljenja. Visok procenat polimorfonuklearnih leukocita nakon teljenja i niske vrednosti uree ustanovljene su i u drugim istraživanjima, gde su ove promene autori povezali sa razvojem endometritisa tokom 5. i 6. nedelje nakon teljenja (Kaufmann i sar., 2010; Senosy i sar., 2012).

2.7.4. Imunosupresija u tranzicionom periodu

Kao što je već ranije navedeno, tranzicioni period prate intenzivne promene, koje dovode do poremećaja odbrambenih funkcija organizma. Teljenje je akutna stresna situacija i uz endogene i hormonske promene, koje karakterišu ovaj period, a dolazi i do promena u vrednostima hematoloških parametara. Kao odgovor na stresnu situaciju, kod krava se u ovom periodu zapažaju pad broja ukupnih leukocita i neutropenija (Gavan i sar., 2010; Tornquist i Rigas, 2010; Belić i sar., 2012; Orrù i sar., 2012). Pored stresa, na ove promene može uticati i NEB. Funkcije hematopoetskih ćelija mogu biti značajno izmenjene usled izraženog negativnog energetskog bilansa, ali samo pri visokoj koncentraciji ketonskih tela (Scalia i sar., 2006; Moretti i sar., 2016). Visoke koncentracije BHB i acetoacetata nakon teljenja mogu kod muznih krava dovesti do intenzivne inhibicije proliferacije hematopoetskih ćelija u kostnoj srži (Hoeben i sar., 1999). Međutim, Moretti i sar. (2016) su dokazali da su kod krava sa umerenim NEB, koje su imale normalan tok porođaja i uspešno izbacile posteljicu, homeoretski mehanizmi bolje funkcionisali. Autori su uočili povećanje broja leukocita i neutrofilnih granulocita i smanjenje broja eozinofilnih granulocita i tumačili ove promene kao normalan odgovor na zapaljenske i stresne stimuluse neophodne za pravilan tok partusa. Oni su takođe registrovali i povećan broj eritrocita, povećanu koncentraciju Hb i veću Hct vrednost prilikom teljenja, što tumače uticajem stresa i umerene dehidracije koja se javlja kod porođaja (Bell, 1995).

Međutim, sve navedene promene nisu dovoljne da objasne imunosupresivni efekat tokom čitavog prelaznog perioda zbog toga što nisu konstantne, a to ukazuje da je fagocitna sposobnost neutrofilnih granulocita zavisna i od drugih faktora. Kao mogući uzrok za nastanak promena navodi se povećana koncentracija glukokortikosteroida u periodu od 24h pre i nakon teljenja (Ingvarsen i Moyes, 2015). Pojedini autori povezuju imunosupresiju sa produkcijom mleka, objašnjavajući ovu pojavu velikim fiziološkim stresom. Uticaj intenzivne funkcije mlečne žlezde na funkcije neutrofilnih granulocita postoji, ali ona nije jedini uzrok imunosupresije u peripartalnom periodu. Za funkcije neutrofilnih granulocita je utvrđeno da slabe pred teljenje i nakon njega, čak i kod krava kod kojih je izvršena mastektomija. Kod njih se funkcije neutrofilnih granulocita brže uspostavljaju, dok se kod krava u laktaciji ova inhibicija funkcije neutrofilnih granulocita zadržava i tokom nekoliko nedelja (Thatcher i sar., 2010).

Izučavanjem promena u fagocitnoj sposobnosti i respiratornom prasku neutrofilnih granulocita tokom peripartalnog razdoblja, dobijeni su kontradiktorni rezultati. Newbould

(1976) i Guidry i sar. (1976) opisuju porast fagocitne sposobnosti i navode da ona dostiže vrhunac dve nedelje pre teljenja i da naglo opada neposredno nakon teljenja. Kehrl i Goff (1989) su takođe uočili viši stepen fagocitoze oko teljenja, a Tan i sar. (2012) smanjenje. Sander i sar. (2011), Graugnard i sar. (2012) i Vailati-Riboni i sar. (2017) navode da kod muznih krava nema promena u fagocitnoj aktivnosti u peripartalnom periodu. Meglia i sar. (2005) i Vailati-Riboni i sar. (2017) nisu uočili promene u respiratornom prasku, dok drugi autori navode slabljenje tokom peripartalnog perioda (Kehrl i Goff, 1989; Piccinini i sar., 2004).

Vailati-Riboni i sar. (2017) ističu da razlike u rezultatima mogu nastati i ako se upotrebljavaju izolovane ćelije ili ćelije iz pune krvi. Prema ovim autorima, izolovane krvne ćelije u testovima ispoljavaju promene u njihovom funkcionalnom kapacitetu, dok se ova pojava uglavnom ne zapaža u ćelijama iz pune krvi.

Laboratorijska istraživanja fagocitnih i baktericidnih funkcija neutrofilnih granulocita su složena i razlike u rezultatima mogu biti posledica ne samo raznolikosti analitičkih metoda, već i odraz individualnih razlika među jedinkama. Tako, temperamentni bikovi imaju povišen nivo kortizola u serumu i njihovi neutrofilni granulociti imaju slabiji respiratorni prasak i manji stepen fagocitoze nego neutrofilni granulociti mirnih priplodnjaka (Caswell, 2014). Ovo ukazuje da je potrebno obratiti pažnju na sve faktore koji bi mogli da utiču na rezultate procene funkcionalne sposobnosti neutrofilnih granulocita naročito tokom tranzicionog perioda kada su promene u organizmu plotkinja velike.

2.8. Uticaj egzogenih faktora na imunski sistem

Kao što je već navedeno, urođeni imunski odgovor predstavlja prvu liniju obrane. On podrazumeva otkrivanje i uništavanje kako izmenjenih sopstvenih ćelija tako i stranih ćelija (antigena) kao što su virusi, bakterije, paraziti i njihovi metaboliti. Efikasan urođeni imunski sistem, bitan je ne samo za efikasno uklanjanje stranih tela (antigena), već i za ubrzanje adaptivnog imunskog odgovora i sprečavanje napredovanja patoloških procesa u organizmu. Svoju funkciju imunski sistem ostvaruje putem fagocitoze za koju su prvenstveno odgovorni makrofagi i neutrofilni granulociti. U velikoj meri, ovi procesi zaviste od sekrecije humoralnih faktora.

Pored endogenih faktora (metaboličkih i endokrinih promena) tokom tranzicionog perioda, uticaj na organizam ispoljavaju i brojni egzogeni faktori, kao što su: ishrana, uslovi smeštaja i različiti patogeni (bakterije, virusi i paraziti), koji mogu prouzrokovati stres i

indirektno uticati na zdravstveno stanje jedinke. Uslovi smeštaja, naročito izloženost visokim temperaturama, prisustvo drugih životinja, kao i problemi u socijalizaciji, mogu takođe smanjiti odbrambenu moć jedinke (Kadzere i sar., 2002; Drackley i sar., 2005; Boyle i sar., 2013).

Za normalno funkcionisanje celog organizma, pa tako i imunskog sistema, neophodna je adekvatna ishrana, a toksini iz hrane, vazduha i vode mogu da imaju veliki uticaj u tom smislu. Kod infekcija se značajan deo energije i proteina troši na odbranu organizma, pa tako "trpi" ceo organizam, jer ne postoji dovoljno adekvatnih resursa. Usled toga dolazi do poremećaja u rastu i razvoju, ali i poremećaja u laktaciji i reprodukciji. Hranljive materije se tada troše na proizvodnju imunskih ćelija, umnožavanje T i B limfocita i sintezu antitela. Samim tim, da bi se održalo zdravlje jedinke i produktivnost, naročito kod mlečnih krava, potrebno je redukovati stresne situacije (Von Keyseklingk i sar., 2009), koje se negativno odražavaju na imunski sistem (Yagi i sar., 2004; Huzzey i sar., 2015).

Primarni cilj tokom tranzicionog perioda krava je da se pruži maksimalna podrška i olakša adaptacija organizma domaćina tokom intenzivnih metaboličkih promena. Potrebno je poboljšati uslove smeštaja i osigurati dobrobit životinja u cilju smanjenja stresa i korigovati ishranu mlečnih grla. U veterinarskoj medicini se sve više izučavaju pojedina prirodna sredstva (začini i biljke) i njihova imunomodularna aktivnost koja mogu uticati na urođeni imunski odgovor i imati ulogu u prevenciji nastanka oboljenja. Fokus brojnih savremenih studija je u iznalaženju metoda stimulacije imunskog sistema, kako na opštem (Vailati-Riboni i sar., 2017), tako i na lokalnom nivou. Tako se navodi mogućnost intrauterine primene imunomodulatora kao alternativni pristup u terapiji endometritisa (Hussain i Daniel, 1992; Singh i sar., 2000; Palanisamy i sar., 2015).

2.8.1. Ishrana i imunitet

Gastrointestinalni trakt ima značajnu ulogu u odbrani organizma domaćina. U njemu je lokalizovan najveći broj limfnih čvorova i na neki način on predstavlja vrlo kompleksan organ imunskog sistema. Kao i koža, gastrointestinalni trakt je prepreka prodoru mikroorganizama što je od velike važnosti za održavanje integriteta organizma. Gastrointestinalni trakt naseljavaju probiotske žive bakterije čije se delovanje ogleda u lokalnoj stimulaciji sazrevanja imunskih ćelija i podsticanju ravnoteže mehanizama odbrane domaćina (Haddad i sar., 2005). Postoje dokazi da korišćenje pojedinih biljaka, kao dodatka

hranivima, ima višestruke prednosti, a između ostalog, i sposobnost uticaja na funkcije urođenog imunskog sistema. Ishrana krava mananoligosaharidima iz grupe probiotika (ugljeni hidrati iz ćelijskog zida gljivica) dokazuje koliko pojedini suplementi u ishrani mogu poboljšati stanje odbrambene moći organizma. Opisan je pozitivan efekat na imunski odgovor kod infekcije rotavirusima i povećan prenos maternalnih antitela sa majke na tele (Lazarević i sar., 2010). Pored pozitivnog efekta na prirast i iskorišćavanje hraniva, kod ishrane svinja mananoligosaharidima utvrđeno je i povećanje indeksa limfocita i neutrofilnih granulocita i to bez povećanja koncentracije proteina akutne faze (Provenza i Villalba, 2010). Potencijalni imunomodulatorni efekat metionina primenom u formulaciji obroka krava proučavali su Pompella i sar. (2003), kao i Shimada i sar. (2015).

Postoje mnogobrojna istraživanja o različitim supstancama koje ispoljavaju svoju aktivnost u digestivnom traktu. Utvrđeno je da dodatak nekih mikro i makroelemenata takođe može pozitivno uticati na odbrambene moći organizma domaćina. Weiss i Hogan (2005) su dokazali da dodatak organskog i neorganskog selena (Se) hranivu, utiče na povećanje njegove koncentracije u serumu i smanjenje incidence pojave mastitisa, a istovremeno stimuliše funkcije neutrofilnih granulocita. Tretman krava u peripartalnom periodu faktorom koji stimuliše rast kolonija granulocita (engl. *granulocyte colony stimulating factor* - G-CSF)), dovodi do povećanja broja polimorfonuklearnih leukocita i povećava njihovu efikasnost (Mitchell i sar., 2003; Kumar i sar., 2010). Gandra i sar. (2016) su ustanovili pozitivan uticaj omega-3-masnih kiselina iz hraniva na procenat leukocita u cirkulaciji, monocita ili neutrofilnih granulocita koji su ispoljavali fagocitnu aktivnost i pre i posle teljenja.

Veliki broj aromatičnih bijaka, začina i etarskih ulja, poboljšava resorpciju hranljivih materija u digestivnom traktu. Od davnina je poznato da ishrana odgovarajućim biljkama može unaprediti zdravlje i dobrobit jedinke (Provenza i Villalbi, 2010). Iako se 60-tih i 70- tih godina prošlog veka njihova upotreba neosnovano smatrala toksičnom i štetnom, danas se njihov potencijal intenzivno izučava. U istraživanju mnogih autora (Kung i sar., 2008; Santos i sar., 2010; Wall i sar., 2014; Perez-Roses i sar., 2015)) dokazan je pozitivan efekat dodatka etarskih ulja (EU) u hranivima, na unos suve materije i na produkciju mleka. Tekippe i sar. (2013) su ukazali na uticaj etarskih ulja na fermentaciju u rumenu. Nasuprot tome, Tassoul i Shaver (2009) nisu utvrdili pozitivan efekat etarskih ulja kod krava u prepartalnom periodu. Rezultati različitih *in vitro* studija su dokazali da su efekti EU i njihovih glavnih komponenata na koncentraciju $\text{NH}_3\text{-N}$ rumena dozno zavisni i da su ova jedinjenja efikasnija kada se koriste u visokim dozama (u poređenju sa niskim). Posmatrajući isti efekat Vakili i

sar. (2013) su ustanovili da se potrebne doze EU razlikuju u *in vitro* i *in vivo* studijama. U visokim dozama, EU i njihovi sastojci mogu inhibirati deaminaciju aminokiselina i smanjiti proizvodnju metana u rumenu (Benchaar i sar., 2008).

Pojačavanje odbrambene moći organizma i prevencija pojave oboljenja podrazumeva izmenu aktivnosti samih faktora/učesnika imunskog odgovora: nekad u pravcu inhibicije, a nekad u pravcu stimulacije. Hu i sar. (1992) su ukazali na sposobnost EU da poboljšaju odbranu organizma proučavajući uticaj 26 različitih etarskih ulja na izolovane neutrofilne granulocite goveda. Imunomodulatorna uloga biljnih preparata je najviše proučavana kod monogastričnih životinja, a u poslednje vreme se povećava broj istraživanja i kod preživara. Tretiranje egzogenim faktorima u cilju stimulacije imunskog odgovora ili neutralisanju štetnih efekata inflamacije se poslednjih godina intezivno proučava u veterinarskoj medicini.

Zbog velikog potencijala, sve više se izučava antioksidativna aktivnost etarskih ulja, koja mogu da vrlo efikasno oslobode organizam od produkata fagocitoze, kao što su nagomilani slobodni radikali. Međutim, sve više se proučavaju i njihova druga svojstva, kao što su: imunomodulatorna, antinflatorna, antivirusna, antigljivična, antikancerogena i druga svojstva.

2.8.2. Etarska ulja

2.8.2.1. Sastav etarskih ulja

Etarska ulja se ekstrahuju iz različitih aromatičnih biljaka i to iz njihovih različitih delova kao što su: cvet, list, seme, plod i koren. Ekstrakcija se može izvesti na nekoliko načina: hidrodestilacijom, destilacijom parom, suvom destilacijom i nemehaničkim procesom (bez toplote). Etarska ulja, kao sekundarni metaboliti biljaka, predstavljaju rezervoare bioaktivnih sastojaka i kompleksne su građe. Obično se sastoje od 20-60 komponenti u različitim koncentracijama. Uglavnom se dve ili najviše tri komponente nalaze u višku (20-70%), dok su ostale komponente u tragovima (Bakkali i sar., 2008). Sastav bioaktivnih komponenti etarskog ulja zavisi od dela biljke iz kog je dobijeno, od načina ekstrakcije, kao i od geografskog porekla biljke, doba godine kada je vršena berba i dr. Svaka od ovih grupa komponenti pokazuje različita farmakološka svojstva. Kakav će efekat etarska ulja ispoljiti zavisi od dominantnih komponenti i ona mogu ispoljiti antiinflamatorno, antioksidativno, antibakterijsko, antivirusno i antikancerogeno dejstvo.

Etarska ulja se sastoje od terpena, terpenoida i fenola (alil-fenoli i propenil fenoli). (Miguel, 2010). Među sastojcima se mogu javiti i aromatični i alifatični delovi etarskog ulja male molekulske mase (Bakkali i sar., 2008). Najzastupljenija grupa komponenti etarskih ulja su terpeni, koji uključuju monoterpene i seskviterpene, a u manjim količinama su prisutni i hemiterpeni, diterpeni, triterpeni i tetraterpeni. Devedeset procenata etarskih ulja čine monoterpeni koji najviše doprinose raznolikosti među etarskim uljima. Terpeni koji sadrže kiseonik nazivaju se terpenoidi. Fenoli su uglavnom glikozidi i vrlo su zatupljeni u biljkama, a najznačajniji su fenolna kiselina i ruzmarinska kiselina (Zgorka i sar., 2001; Miguel, 2010).

2.8.2.2. Antioksidativna aktivnost etarskih ulja

Antioksidativna aktivnost različitih biljnih ekstrakata i etarskih ulja je intenzivno proučavana, kako u *in vivo*, tako i u *in vitro* ogledima. Kao antioksidansi, ona na neki način, predstavljaju fizičke barijere ili "hemijske zamke". Antioksidativna aktivnost neisparljivih biljnih ekstrakata pripisana je prisustvu fenolnih jedinjenja, odnosno fenolnih kiselina, katehina i flavonoida. Poznato je da fenolna jedinjenja igraju važnu ulogu u stabilizaciji lipida, peroksidaciji i inhibiciji različitih oksidacionih enzima (Serrano i sar., 2011). Etarska ulja mogu da apsorbuju energiju, elektrone, "hvataju" ROS i reaktivne proizvode azota (RNS) i da ih neutrališu (Miguel, 2010).

U literaturi postoje brojni podaci o rezultatima proučavanja antioksidativnih efekata velikog broja etarskih ulja poreklom od različitih biljaka, kao što su: *Mentha* (nana) (Cosentino i sar., 2009), *Satureja Montana* (rtanjski čaj) (Chrpová i sar., 2010; Zeljković i sar., 2015), *Thymus vulgaris* (timijan) (Zydadilo i sar., 1995; Lee i sar., 2005; Fachini Querioz i sar., 2012; Petrović i sar., 2014), *Eucalyptus* (eukaliptus) (Serafino i sar., 2008) i mnoga druga. Kao vrlo efekasan u usporavanju oksidativnog stresa prouzrokovanog slobodnim radikalima posebno se pokazao timijan (Petrović i sar., 2014). Lee i sar. (2005) su utvrdili da *Thymus vulgaris* ispoljava izrazitu antioksidativnu aktivnost, čak mnogo veću od sintetskih antioksidanasa kao što su butilovani hidorkisitoulen i alfa - tokoferol. U *in vitro* uslovima, fenolne komponente imaju antioksidativnu aktivnost i inhibiraju lipidnu peroksidaciju. Fenoli direktno uklanjaju reaktivne vrste kiseonika kao što su hidroksilni radikali, peroksinitrit i hipohlorna kiselina. Antioksidativnu ulogu fenola određuje njihov visok red-oks potencijal, koji im omogućava da deluju kao redukujući agensi, vodonikovi donori i "hvatači" nascentnog kiseonika (1O_2) (Miguel, 2010).

Zydadlo i sar. (1995) su visoku antioksidativnu aktivnost etarskih ulja *Thymus vulgaris* i *Laurus nobilis*, u poređenju sa etarskim uljem *Foeniculum vulgare* var. *duke* i etarskim uljem *Eucalyptus globules*, kod kojih je antioksidativna aktivnost bila nešto manja, pripisali velikoj koncentraciji fenolnih komponenti. Kod etarskog ulja *L. nobilis* sadržaj eugenola je 30%, a kod *Thymus vulgaris* sadržaj timola je 30% i karvakrola 15%. Interesantno je to što etarska ulja *F. vulgare* i *E. globules*, koja su imala solidnu antioksidativnu aktivnost, nisu sadržavala ove fenolne komponente (Miguel, 2010). Mehanizam delovanja ovih produkata nije još tačno utvrđen i pojedini autori njihovu aktivnost objašnjavaju prisustvom određenih sastojaka u višku, dok drugi opet naglašavaju da je ovde od većeg značaja sinergizam svih komponenti u etarskom ulju (Franzios i sar., 1997; Santana-Rios i sar., 2001; Hoet i sar., 2006; Bakkali i sar., 2008). Cosentino i sar. (2009) su, proučavajući antioksidativne aktivnosti različitih vrsta *Menthae*, došli do zaključka da razlike u sastavu (najvećim delom razlike u sadržaju mentofurana i limonena) mogu dovesti do razlika u jačini antioksidativne aktivnosti pojedinih vrsta *Menthae*. Isti autori navode da je moguće da postoji, kako sinergizam tako i antagonizam, među pojedinim komponentama etarskih ulja, koji bi takođe mogli uticati na intenzitet njihove aktivnosti.

2.8.2.2. Antiinflamatorna aktivnost etarskih ulja

Ekstrakti biljaka mogu da stimulišu fiziološke odbrambene sposobnosti organizma, ali u kojoj će meri ova aktivnost biti ispoljena određuje hemijski polimorfizam etarskog ulja. Antinflatornu aktivnost etarska ulja vrše na 3 načina: preko metabolizma arahidonske kiseline, uticajem na produkciju pojedinih citokina i indukovanjem promena u ekspresiji proinflamatornih gena. Proučavajući imunomodulatorne efekte 5 različitih vrsta bosiljka, Singh i saradnici (2016) su ustanovili da se aktivnost bosiljka zasniva uticajem na produkciju proinflamatornih faktora: IL-6 i TNF- α . Ovi citokini učestvuju u regulaciji imunskih reakcija, zapaljenjske reakcije i hematopoeze. Glavni proinflamatorni citokin, od koga zavisi inicijacija zapaljenjskog odgovora je TNF- α i njegova inhibicija ima za posledicu povećanu podložnost infekcijama. Povećanje koncentracije ovog citokina prati posledično i povećanje koncentracije IL-6, koji je takođe odgovoran za nastanak i tok zapaljenjskog odgovora (Singh i sar., 2016).

2.8.2.3. Imunomodularna aktivnost etarskih ulja

Pojedini autori smatraju da antioksidativni efekti pojedinih etarskih ulja ukazuju i na njihovu antiinflamatornu ulogu (Vinda Martos i sar., 2009; Cosentino i sar., 2009; Miguel, 2010; Fachini Querioz i sar., 2012). Podaci do kojih su došli Cosentino i sar. (2014) potvrđuju imunomodularnu aktivnost etarskog ulja bergamota, koje podstiče produkciju reaktivnih vrsta kiseonika u neutrofilnim granulocitima. Serafino i sar. (2008) su proučavali uticaj etarskog ulja eukaliptusa na fagocitnu sposobnost makrofaga, a Kummer i sar. (2013) su, pored antiinflamatornog uticaja etarskog ulja limuna, proučavali i njegov uticaj na hemotaksu eozinofilnih granulocita. Bukovska i sar. (2007) su uočili imunomodulatornu aktivnost origana smanjenjem količine informacione ribonukleinske kiseline (iRNK) za proinflatorne citokine (IL-1 β i IL-6) u tkivu debelog creva miševa sa kolitisom. Imunomodulatorni efekat je dokazan i primenom komercijalnih produkata koji sadrže kombinacije različitih biljnih produkata. Komercijalni aditiv "Oregpig", koji sadrži mešavinu fenolnih grupa (60 g karvakrola i 55 g timola/kg), ima stimulatívni nespecifični efekat na ćelije imunskog sistema prasadi i utiče na proporciju CD4⁺ i CD8⁺ ćelija kao i na ekspresiju antigena klase MHC II (Juhas, 2008). Oh i sar. (2013; 2015) su u *in vivo* istraživanjima uočili imunostimulatívni efekat pojedinih etarskih ulja.

2.8.3. Familija *Lamiaceae*

Poznato je da većina začina, posebno onih iz porodice *Lamiaceae*, ima širok spektar bioloških i farmakoloških aktivnosti (Božin i sar., 2006). Na osnovu podataka iz najnovije literature, porodica *Lamiaceae* se čini bogatim izvorom biljnih vrsta koje sadrže znatne količine fenolnih jedinjenja (eugenol, karvakrol, timol), koja mogu uticati na na imunski odgovor (Zgorka i Głowniak, 2001; Vattem i sar., 2013; Orhan i sar., 2016), i izraženu antioksidativnu i antibakterijsku aktivnost (Uribe i sar., 2016). Bez obzira na činjenicu da postoje značajni dokazi o uticaju biljaka iz familije *Lamiaceae* na neke segmente imunskog odgovora, ipak postoji nedostatak relevantnih podataka o *in vivo* efektu *Lamiaceae* biljaka na parametre urođenog imunološkog odgovora.

2.8.3.1. *Mentha piperita*

Menta (*Mentha piperita*) je višegodišnja biljka koja pripada porodici *Lamiaceae* i predstavlja prirodni hibrid dobijen ukrštanjem dve vrste: *Mentha aquatica* L. i *Mentha spicata*. Etarsko ulje mente se sastoji, pre svega, od mentola i mentona. U ukupnom sadržaju

mentol je zastupljeniji, a njegova količina se povećava kako biljka sazreva. Prema Evropskoj Farmakopeji (Ph.Eur.8), sadržaj mentona treba da bude oko 14-32%, a mentola 30-55% ukupnog sadržaja etarskog ulja mente. Proučavajući sastav *Menthae piperitae* koje potiču iz različitih regiona sveta, Aflatuni i sar. (2000) su ustanovili da su kod svih najzastupljenije komponente upravo menton i mentol. Manje zastupljeni sastojci su limonen, E-cineol, mentofuran, pulegon i mentil - acetat. Njihova zastupljenost u ukupnom sadržaju zavisi od delova biljke i berbe. Cosentino i sar. (2009) su u istraživanjima na leukocitima ljudi utvrdili antioksidativni i imunomodularni efekat etarskog ulja mente. Proučavan je i efekat etarskih ulja ove biljke na funkcije efektorskih ćelija imunskog sistema. Za etarska ulja mente, kao i za njihove pojedine sastojke (kao što su kvercetin i apigenin) ustanovljeni su inhibitorni efekti na produkciju proinflatornog citokina TNF- α , dok je za ruzmarinsku i kofeinsku kiselinu ustanovljeno da inhibira produkciju ROS u izolovanim leukocitima kao i u punoj krvi (Orhan i sar., 2016). Adel i sar. (2015) su proučavali uticaj ekstrakta mente u ishrani riba i uočili poboljšanje rasta. Oni su takođe uočili i imunostimulatorno dejstvo mente na urođeni imunitet (i na lokalnom i na sistemskom nivou), kao i uticaj na neke hematološke parametre. Značajno poboljšanje nespecifičnog imuniteta kod riba pod uticajem *M. piperita* kao dodatka u hranu, uočili su i drugi autori (Abasali i Mohamad, 2010; Talpur i sar., 2014). Imunomodulatorni efekti *M. piperita* i njenih sastojaka takođe su ispitivani kod zamoraca i miševa (Arakava i sar., 1992; Arakava i Osava, 2000). Hosoda i sar. (2005) su istraživali uticaj mente kao dodatka u hranivo muznih krava u laktaciji i procenjivali uticaj na varenje hranjivih materija, energetske metabolizam, fermentaciju u buragu i proizvodnju mleka. Menta je u izvesnoj meri smanjivala svarljivost hrane i stvaranje metana uz uticaj na energetske metabolizam. Nije utvrđen njen uticaj na fermentaciju u buragu i na proizvodnju mleka.

2.8.3.2. *Satureja Montana*

Satureja Montana je biljka iz familije *Lamiaceae* i jedna od 13 vrsta kod koje su farmakološka dejstva najviše proučavana. Istraživanja su se najvećim delom odnosila na procenu antimikrobnih svojstava, ali su dokazani i značajni antioksidativni, antidijabetički i antiholesterolski efekti (Jafari i sar., 2016). Antimikrobna svojstva su najintenzivnije proučavana kod *S. hortensis* i *S. montana*. Njihove fenolne komponente se smatraju nosiocima antimikrobne, ali i antioksidativne aktivnosti (Serano i sar., 2011). U *S. Montana*, prevladavaju fenolna jedinjenja, kao što su kofeinska i ruzmarinska kiselina i monoterpeni.

Abd El Tawab i sar. (2014) smatraju da upravo ona daju dobar zaštitni potencijal protiv prekomerne proizvodnje ROS-a, direktnim i indirektnim antioksidativnim mehanizmima.

Koliko geografsko poreklo utiče na sastav, a samim tim i na efekat etarskih ulja ukazuje i istraživanje Marina i sar. (2012). Upoređujući hemijske formulacije *S. Montana* oni su uočili da je kod etarskog ulja sa područja Dalmacije, Biokova i ostrva Brač dominantna komponenta karvakrol, dok je na jugu Republike Hrvatske isto ovo etarsko ulje imalo veći sadržaj timola (30,88–46,02%). Sadržaj karvakrola je iznosio svega 3,81 - 6,86%. *Satureja montana* iz zapadne Srbije je kao dominantne komponente imala linalool i p-cimen, a karvakrol je bio zastupljen sa svega 0,4%. U uzorcima iz Makedonije, sadržaj karvakrola je bio 18,3%. Ovi rezultati se moraju uzeti u obzir prilikom upoređivanja uočenih efekata zbog činjenice da postoje kontradiktornosti u mehanizmima dejstva što se može objasniti razlikama u hemijskom sastavu (Tepe i Cilkiz, 2015).

2.8.3.3. *Thymus vulgaris*

Među mnogim ekstraktima biljaka koji se daju preko hraniva, možda je najviše ispitivano dejstvo timijana (majčina dušica) i to kod svinja, ćuraka i brojlera (Kovács i sar., 2011). Proučavajući efekte etarskog ulja timijana, Fachini Querioz i sar. (2012) su utvrdili da ono deluje i antioksidativno i antinflatorno. Istovremeno, uz inhibiciju migracije ćelija i manje oštećenje tkiva, ulje timijana dovelo je do smanjenja količine inflamatornog eksudata u *in vivo* ogledu u modelu indukovano pleuritisa. Dodatak timijana u hranivo znatno povećava aktivnost superekhid dismutaze i glutation peroksidaze i ukupni antioksidativni kapacitet. Amirghofran i sar. (2011, 2012) su proučavajući potencijalni efekat *T. vulgaris* i još dve biljke iz familije *Lamiaceae* na aktivaciju limfocita, uočili njihovo imunosupresivno dejstvo. Ovakav efekat su objasnili prisustvom timola kao dominantne komponente. Pojedini autori (Ardenne i Reitnauer, 1981), navode da ekstrakt timijana izaziva značajnu stimulaciju leukopoeze i povećanje broja trombocita u krvi. Međutim, Abed i sar. (2011) nisu uočili da ekstrakt timijana povećava broj leukocita. Istovremeno, Kovacs i sar. (2011) nisu zapazili uticaj na produkciju antitela pri dodatku timijana u hraniva kunića. Toghyani i sar. (2010) takođe nisu dokazali dejstvo timijana na imunski sistem pri ishrani brojlera timijanom, dok je pozitivan uticaj na prirast bio očit, usled poboljšanja svarljivosti hranljivih materija. Sadeghmi i saradnici (2012) nisu uočili efekat timijana na prirast kod brojlera, ali je timijan u ovom ogledu korišćen preko vode zajedno sa cimetom i kurkumom i zapažen je snažniji imunski

odgovor nakon vakcinacije. Emeish i El-deen (2016) takođe nisu dokazali uticaj na fagocitozu nakon ishrane riba za dodatkom timijana.

Primećeno je i da se efekti biljaka koji pripadaju istoj porodici razlikuju. Razlike u efektu etarskih ulja postoje čak i kod istih biljaka u zavisnosti od modela istraživanja i vrste rastvarača tokom procesa ekstrakcije. Efekat biljnog ekstrakta varira i od regiona do regiona, što može biti posledica mnogih faktora kao što su uticaj klime i sastava tla. Razlike u metodologiji takođe mogu uticati na razlike u rezultatima. Antibakterijska aktivnost se razlikuje u zavisnosti od zapremine inokuluma, medijuma za kultivisanje ili bakterijskog soja (Kozłowska i sar., 2015). Biljke iz porodice *Lamiaceae* imaju veliku sličnost u glavnim sastojcima i širokom spektru farmakoloških svojstava. Postoje, ipak dokazi koji ukazuju na to da ove biljke takođe mogu posedovati sastojke sposobne da utiču na ukupnu aktivnost etarskog ulja i na moduliranje imunskog odgovora, iako su zastupljeni u manjim količinama (Mogosan i sar., 2017).

2.8.4. Armenicum[®]

Danas se čine veliki naponi da se dođe do leka koji deluje na što više patogenih mikroorganizama, koji ima nisku toksičnost, kompatibilan je sa domaćinom i ne dovodi do rezistencije, a da po svojoj ulozi bude sličan ćelijama ubicama (NK) i da lako prepoznaje strane supstance u organizmu. Vodeći se ovim načelima Davtyan i sar., (2004) su izneli prve rezultate o kompleksu jodin-litijum- α -dekstrin (IL α D) (Armenicum[®]).

Aktivni sastojci ovog kompleksa su jod i litijum, vezani su za dva nosača, α -dekstrin i polivinil-alkohol. On ispoljava imunomodulatorne, antimikrobne, antivirusne i antifugalne efekte. U ostvarivanju ovih efekata učestvuju sve komponente, koje se međusobno dopunjuju. Poznato je da se jod u vodenim rastvorima javlja u različitim oblicima. Pojedini oblici imaju izraženu antimikrobnu aktivnost, drugi oblici su slabi oksidansi i imaju mali uticaj na mikrobe, dok neki uopšte ne ispoljavaju antimikrobnu aktivnost. Antimikrobna dejstva joda i njegovih preparata zasnovana su na sposobnosti izmene metaboličkih procesa u patogenim mikroorganizmima, usled visoke oksidativne aktivnosti molekularnog joda (Davtyan i sar., 2009). Litijum inhibira inozitol monofosfatazu i glikogen sintazu kinazu-3 (GSK-3). Nedostatak GSK-3 pod dejstvom litijuma ili drugih inhibitora, smanjuje produkciju proinflamatornih interleukina - IL-6, IL-1 β , IL-12, IFN γ i faktora nekroze tumora (TNF) u

TLR-stimulisanim monocitima za 67-90% (Beurel i sar., 2010). Usled uticaja na granulocitozu, litijum se koristi u lečenju različitih vrsta neutropenija. Ovo njegovo delovanje autori objašnjavaju uticajem na indukciju stvaranja faktora stimulacije kolonija granulocita, što utiče na povećanje broja hematopoetskih matičnih ćelija (Beurel i sar., 2010). Lieb (2004) ukazuje i na stimulaciju nekih *in vitro* imunskih reakcija pod dejstvom litijuma. Litijum ima i izrazito dejstvo na proliferaciju i diferencijaciju imunskih i granulopoetskih ćelija, kao i regulatorne efekte na citokine koji omogućavaju bolju odbranu domaćina od virusnih infekcija, posebno od DNA virusa (Davtyan i sar., 2009).

Priroda polisaharidnog matriksa samo još poboljšava aktivnost Armenicum-a[®]. On, pored toga što utiče na formiranje pojedinih fizičko-hemijskih osobina kompleksnih jedinjenja (rastvorljivost u vodi, osobine tečnih kristala i koloidnog rastvora i brzina difuzije halogena), poboljšava i antibakterijske, antivirusne i imunomodulatorne osobine IL α D. Derivati dekstrana ispoljavaju širok spektar dejstava kao što su antivirusna, antineoplastična i antikoagulantna aktivnost. Antivirusna aktivnost sulfatnih dekstrana je direktna i posredovana je aktivacijom makrofaga i indukcijom sinteze interferona. Dekstrani se mogu specifično vezivati i za CD2 molekule T-limfocita koji inhibiraju adheziju T limfocita na endotelne ćelije.

Rezultati Davtyan-a i sar. (2004) su ubedljivo dokazali da je IL α D moćan regulator respiratornog praska fagocitnih ćelija. On utiče na nakupljanje većih količina hipohalidne kiseline neutrofilnih granulocita stimulisanih sa PMA i fMLP (hemotaksični peptid N-formil-Metil-Leucil-Fenil) i to, kako u medijumu sa hloridnim jonima tako i bez njih (Davtyan i sar., 2007). On može imati sličnu aktivnost kao enzim MPO čak i u odsustvu neutrofilnih granulocita (Davtyan i sar., 2009).

3. CILJEVI I ZADACI

Osnovni ciljevi ove doktorske disertacije su bili da se:

1. utvrdi stepen funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita iz pune krvi krava u periodu pre teljenja;
2. utvrdi stepen funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita iz pune krvi krava u periodu posle teljenja;
3. utvrditi uticaj biljnih ekstrakta i antiseptika na proces fagocitoze i respiratornog praska neutrofilnih granulocita iz pune krvi krava pre teljenja ;
4. utvrditi uticaj biljnih ekstrakta i antiseptika na proces fagocitoze i respiratornog praska neutrofilnih granulocita iz pune krvi krava posle teljenja.

Za realizaciju ovih ciljeva postavljeni su sledeći istraživački zadaci:

1. da se ispita hematološki profil svih krava u ogledu, od 3. nedelje pred očekivani termin teljenja do 6. nedelje nakon teljenja, i povezanost sa funkcionalnom aktivnošću neutrofilnih granulocita;
2. da se ispita metabolički profil svih krava u ogledu, od 3. nedelje pred očekivani termin teljenja do 6. nedelje nakon teljenja i povezanost sa funkcionalnom aktivnošću neutrofilnih granulocita;
3. da se odredi telesna kondicija krava na početku i na kraju ispitivanja;
4. da se u *in vitro* uslovima, ispita uticaj tri različita etarska ulja i jednog antiseptika na stimulaciju fagocitoze i respiratorni prasak neutrofilnih granulocita iz pune krvi.

4. MATERIJAL I METODE

Ispitivanja u okviru ove disertacije su bila podeljena u dve celine:

- 1) ispitivanje uzročno-posledične veze između funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita i endogenih faktora;
- 2) ispitivanje uticaja različitih egzogenih faktora na funkcionalnu aktivnost neutrofilnih granulocita.

U skladu sa tim korišćen je materijal i primenjivane su metode koji se opisuju u tekstu koji sledi.

4.1. Materijal

4.1.1. Ogledne životinje

Ispitivanja u okviru ove doktorske disertacije su sprovedena na komercijalnoj govedarskoj farmi u okolini Subotice, tokom 2017. godine. Ispitivanja su završena u decembru 2017. godine. Farma je imala 195 krava na muži, u slobodnom sistemu držanja. Zasušene krave su držane izdvojeno u ispuštima sa nadstrešicom sve do 15-20 dana pre očekivanog teljenja, kada se prevode u porodilište. U porodilištu su boravile 5-6 dana nakon teljenja. Krave sa zdravstvenim problemima (ketoza, zaostala posteljica, mastitis) zadržavane su u porodilištu do sanacije problema.

Ishrana krava je bila zasnovana na kompletno izmešanom obroku koji je dostavljan dvokratno. Obrok je bio baziran na senu i senaži lucerke, silaži cele biljke kukuruza i cele biljke raži i koncentrovanog obroka za visokomlečne krave, uz dodatak premiks AFC1 (Animal Food, doo Beočin), Fosfazel forte (Animal Food, doo Beočin) kao izvor Ca i P i Easylin (VALOREX La Messayais, Combourtillé, France) kao izvor omega 3 masnih kiselina.

Podaci sa farme su evidentirani i analizirani softverskim programom za vođenje evidencije UNIFORM-Agri software (UNIFORM-Agri, Assen, Holandija). Podaci su unošeni svakodnevno.

Za uzorkovanje krvi je odabrana 21 krava u prepartalnom periodu. Krv je uzorkovana u tri intervala: pred očekivani termin partusa (I, II, III) i u četiri intervala nakon partusa (IV,V,VI,VII). Krave u ogledu su bile simentalne rase.

4.1.2. Biljni materijal i antiseptik

4.1.2.1. Obrada biljnog materijala

Biljni materijal koji je korišćen za ispitivanja je poticao od različitih vrsta lekovitog bilja gajenog, na oglednom polju Instituta za ratarstvo i povrtarstvo iz Novog Sada, Odeljenja za organsku proizvodnju i biodiverzitet u Bačkom Petrovcu. Odabrane su sledeće vrste i delovi biljaka: herba mente u cvetu (*Menthae herba*), herba čubra u cvetu (*Saturejae herba*) i herba timijana u cvetu (*Thymii herba*).

Uzorci su nakon razdvajanja po biljnim organima sušeni prirodnim putem. Posle sušenja sadržaj vlage bio je oko 10% (m/m). Osušeni uzorci su čuvani u papirnim vrećama do ekstrakcije i dalje analize.

4.1.2.2. Izolovanje etarskih ulja

Etarska ulja su dobijena od herbe nane u cvetu (*Menthae herba*), herbe rtanjskog čaja u cvetu (*Saturejae herba*) i herbe timijana u cvetu (*Thymii herba*), destilacijom pomoću vodene pare, prema postupku evropske farmakopeje (Ph.Eur.8 (2.8.12.)).

Etarsko ulje mente (Aetheroleum Menthae piperitae)

Postupak dobijanja etarskog ulja mente: odmerena masa biljnog materijala je prenetu u balon za destilaciju i dodata je voda kao tečnost za destilaciju, a u bočnu graduisanu cev je naliveno 0,5 ml ksilena. Odnos mase biljnog materijala i vode bio je 1:10. Destilacija je izvođena tokom 2h, brzinom od 3- 4 ml/min. Dobijeno etarsko ulje je odvojeno dekantacijom od vode. Etarsko ulje je odvojeno od rastvarača destilacijom na rotacionom vakuum uparivaču na temperaturi koja nije prelazila 50°C. Etarsko ulje je čuvano u tamnoj staklenoj ambalaži, na tamnom i hladnom mestu, do momenta upotrebe za analize.

Etarsko ulje čubra/ Rtanjskog čaja (Aetheroleum Saturejae)

Postupak dobijanja etarskog ulja čubra: odmerena masa biljnog materijala je prenetu u balon za destilaciju i dodata je voda kao tečnost za destilaciju. Odnos mase biljnog materijala

i vode bio je 1:13. Destilacija je izvođena tokom 2h, brzinom od 3 ml/min. Dobijeno etarsko ulje je odvojeno dekantacijom od vode i osušeno sa anhidrovanim natrijum-sulfatom. Nakon odvajanja sredstva za sušenje filtracijom, ulje je čuvano u tamnoj staklenoj ambalaži, na tamnom i hladnom mestu, do momenta upotrebe za analize.

Etarsko ulje timijana (Aetheroleum Thymii)

Postupak dobijanja etarskog ulja timijana: odmerena masa biljnog materijala je prenetu u balon za destilaciju i dodata je voda kao tečnost za destilaciju. Odnos mase biljnog materijala i vode bio je 1:13. Destilacija je izvođena tokom 2h, brzinom od 3 ml/min. Dobijeno etarsko ulje je odvojeno dekantacijom od vode i osušeno sa anhidrovanim natrijum-sulfatom. Nakon odvajanja sredstva za sušenje filtracijom, ulje je čuvano u tamnoj staklenoj ambalaži, na tamnom i hladnom mestu, do momenta upotrebe za analize.

4.1.2.3. Antiseptik

Ispitivani antiseptik Armenicum^{®1} je preparat na bazi joda koji kao drugu aktivnu komponentu sadrži litijum. Aktivne komponente su povezane polisaharidnim nosačem (α -dekstrin) i polivinil alkoholom. U ukupnoj zapremini od 20 ml nalazi se: 0,16 g joda (I_2), 0,24 g kalijum-jodida (KJ), 0,004 g litijum-hlorida (LiCl), 0,06 g polivinil alkohola, 20 g α -dekstrina i 0,114 g natrijum-hlorida (NaCl). Sve ove komponente se nalaze u dinamičkoj ravnoteži, uz mogućnost reorganizacije komponenti u zavisnosti od pH, koncentracije i temperature ovog vodenog rastvora. Polisaharidni nosač ima dvostruku ulogu i odgovoran je za formiranje definitivnih fizičko-hemijskih osobina kompleksa. Osim toga, doprinosi i poboljšanju antibakterijskih, antivirusnih i imunomodulatornih svojstva ovog kompleksa.

4.2. Metode

Prvi deo ispitivanja je imao za cilj ispitivanje postojanja uzročno-posledične veze između funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita i vrednosti laboratorijskih nalaza za endogene faktore (parametre krvne slike i metaboličkog profila), u periodu od 3. nedelje pre do 6. nedelja nakon partusa. Krv je uzorkovana punkcijom *v. coccigealis* (repne vene) u 7 termina:

¹ Preparat Armenicum[®] je dobijen ljubaznošću prof dr Tigrana Davtyana iz Laboratorije za imunologiju i virusologiju Jermenskog istraživačkog centra, Republika Jermenija.

tri nedelje pred očekivani termin partusa (I termin), dve nedelje pred očekivani termin partusa (II termin) i jednu nedelje pred očekivani termin partusa (III termin), kao i prve nedelje nakon teljenja (IV termin), druge nedelje nakon teljenja (V termin), treće i šeste nedelje nakon teljenja (VI i VII termin), kod svake od 21 krave.

Ukupno je u 147 uzoraka urađena analiza kompletne krvne slike i određeni su parametri metaboličkog profila. Određivano je 12 parametara za krvnu sliku i 13 parametara metaboličkog profila kod svake životinje u svakom terminu.

4.2.1. Uzorkovanje i transport uzoraka

Uzorci krvi za utvrđivanje fagocitne sposobnosti, respiratornog praska i određivanja kompletne krvne slike uzimani su punkcijom *v. coccigealis* u vakutajnere sa heparinom, zapremine 10 ml (BD Vacutainer®LH, Plymouth, Velika Britanija, 170 IJ litijum heparina). Kolekcija krvi radi dobijanja krvnog seruma vršena je punkcijom *v. coccigealis*. Krv je prikupljana u vakutajnere bez antikoagulansa, sa stimulatorom koagulacije, zapremine 10 ml (BD Vacutainer®, CAT, Plymouth, Velika Britanija). Vakutajneri su bili obeleženi brojem sa ušne markice krave.

Uzorci su čuvani i transportovani na ledenim ulošcima horizontalno postavljeni u frižider torbi i stiroporom odvojeni od direktnog kontakta sa ledom. Temperatura uzoraka nije prelazila 8°C. Uzorci su dopremani u laboratorije NIV-NS najkasnije 3 sata nakon uzorkovanja. Analize su vršene u narednih 6 sati od uzimanja uzoraka.

Celokupan laboratorijski rad izvršen je u laboratorijama Naučnog instituta za veterinarstvo "Novi Sad", u Novom Sadu, na Odeljenju za reprodukciju i na Odeljenju za serološko-imunološka i biohemijska ispitivanja.

4.2.2. Određivanje i kvantifikacija hematoloških parametara krvi:

U radu su određivani sledeći hematološki parametri:

1. broj leukocita (Le);
2. broj neutrofilnih granulocita (Ne);
3. broj limfocita (Ly);
4. procenat limfocita (Ly %);
5. procenat monocita (Mo %);
6. procenat neutrofilnih granulocita (Ne %);

7. broj eritrocita (Er);
8. koncentracija hemoglobina (Hb);
9. hematokritska vrednost (Hct);
10. srednja zapremina eritrocita - MCV;
11. prosečna količina hemoglobina u eritrocitima - MCH;
12. prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitima - MCHC.

Ispitivanja hematološkog profila (crvene i bele krvne slike sa leukogramom) vršeno je iz pune krvi najkasnije 3 sata od uzorkovanja na automatskom hematološkom analizatoru (Abacus Junior Vet, Diatron MI PLC, Mađarska). Parametri su analizirani u 3 termina pre teljenja (treće, druge i prve nedelje pre očekivanog termina teljenja) i u 4 termina nakon teljenja (prve, druge, treće i šeste nedelje nakon teljenja). Krvni razmazi su analizirani nakon bojenja po Gimzi (Štark, 1958).

4.2.3. Biohemijske analize metaboličkih parametara u krvi

Krvni serum je izdvajan centrifugiranjem na 3 000 g tokom 10 minuta. Temperatura centrifuge je tokom svih postupaka bila podešena na 4°C (Eppendorf centrifuge 5804R, Nemačka). Nakon raslojavanja krvnog seruma i ćelijskih elemenata, odlivano je 200 do 400µl krvnog seruma u plastične Eppendorf epruvete (Eppendorf Tubes[®], Eppendorf AG, Hamburg, Nemačka), koje su potom čuvane na temperaturi od 4-8°C do momenta analiza (ne duže od 2 dana).

Kvantifikacija metaboličkih parametara u u krvnim serumima vršena je prema originalnom uputstvu proizvođača, različitim kolorimetrijskim metodama korišćenjem spektrofotometra na polu-automatskom biohemijском analizatoru (Rayto, RT-1904C, NR Kina). Princip ovih metoda bazira se na formiranju obojenih kompleksa koji se zatim mogu izmeriti spektrofotometrijski. Za AST, ALT, ureu, ukupni bilirubin, kalcijum, magnezijum, fosfor, NEMK i BHB korišćeni su komercijalni testovi proizvođača BioSystems S.A. Barcelona, Španija. Za utvrđivanje koncentracije ukupnih proteina i albumina korišćeni su komercijalni testovi proizvođača Clinichem Limited Company, Mađarska.

Analizirani su sledeći parametri metaboličkog profila:

1. koncentracija ukupnih proteina;
2. koncentracija albumina;
3. koncentracija globulina;
4. koncentracija uree;
5. koncentracija neesterifikovanih masnih kiselina (NEMK);
6. koncentracija β -hidroksi-butirata (BHB);
7. koncentracija bilirubina;
8. koncentracija glukoze;
9. aktivnost aspartat aminotransferaze (AST);
10. aktivnost alanin aminotransferaze (ALT);
11. koncentracija kalcijuma;
12. koncentracija fosfora;
13. koncentracija magnezijuma.

4.2.4. Ocena telesne kondicije krava

Ocena telesne kondicije (OTK) krava je vršena na početku oglada (I termin - 3 nedelje pre očekivanog termina teljenja) i na kraju oglada (VII termin - 6 nedelja nakon teljenja), na osnovu kriterijuma Edmonson-a i sar. (1989) kao što navode Milovanović i sar. (2005).

4.2.5. Kvantitativni i kvalitativni test stepena fagocitoze kod neutrofilnih granulocita

Ukupno je 147 uzoraka je pregledano na kvantitativni i kvalitativni test fagocitne sposobnosti i respiratornog praska (ROS test) neutrofilnih granulocita iz uzoraka pune krvi.

Ispitivanje fagocitne sposobnosti neutrofilnih granulocita, odnosno kvantitativno određivanje fagocitne sposobnosti neutrofilnih granulocita vršeno je iz uzoraka pune krvi krava uz dodatak antikoagulansa (heparin). Za određivanje je korišćen komercijalni kit „Phagotest[®]“ (Glykotype Biotechnology GmbH, Heidelberg, Nemačka). Na osnovu tačno propisane procedure, prema uputstvu proizvođača ovog komercijalnog testa, određivan je procenat granulocita koji su izvršili fagocitozu (jedne ili više bakterija), kao i fagocitna sposobnost pojedinačnih ćelija (broj fagocitovanih bakterija po ćeliji), odnosno, njihova aktivnost i to sa i bez dodataka različitih koncentracija tri etarska ulja i jednog antiseptika.

U testu se koriste i opsonizovane i neopsonizovane bakterije kako bi se istovremeno mogla meriti sposobnost opsonizacije i fagocitoze. Kao fagocitne čestice su korišćene opsonizovane bakterije *E. coli* obeležene fluoresceinom (FITC- fluorescein-izo-tio-cijanat). Bakterije *E. coli* su opsonizovane imunoglobulinima i kompleментом iz zbirnog seruma krava. Čelije fagocitnog sistema (neutrofilni i eozinofilni granulociti) imaju receptore za komponentu komplementa (C3b) kao i za Fc fragmente imunoglobulina, pa je preko njih omogućena adherencija ćelije za površinu bakterije. Rezultati reakcije su očitavani na protočnom citometru (Guava easy Cyte, Guava Technologies, Hayward, California, SAD).

4.2.6. Kvantitativni i kvalitativni test respiratornog praska kod neutrofilnih granulocita

Ispitivanje respiratornog praska, odnosno kvantitativno određivanje proizvodnje oksidativnog (respiratornog) praska vršeno je komercijalnim testom „Phagoburst[®]” (Glykotype Biotechnology GmbH, Heidelberg, Nemačka), sa i bez dodataka različitih koncentracija tri etarska ulja i jednog antiseptika. Ispitivanje je vršeno u uzorcima pune krvi krava sa antikoagulansom (heparin). Komercijalni test „Phagoburst[®]“ sadrži neobeležene opsonizovane bakterije *E. coli*, forbol 12-miristat 13-acetat (PMA) i hemotaktični peptid N-formil-Metil-Leucil-Fenil (fMLP) kao stimulatore oksidativnog praska. 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.

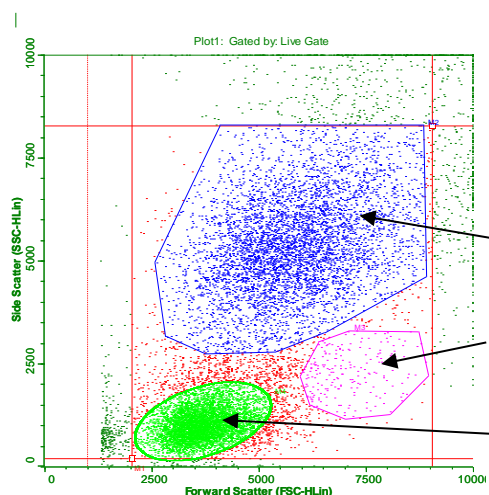
Na osnovu tačno propisane procedure, prema uputstvu proizvođača ovog komercijalnog testa, može se pratiti produkcija reaktivnih radikala kiseonika. Rezultat stimulacije neutrofilnih granulocita je formiranje reaktivnih peroksida koji se prate dodavanjem i oksidacijom dihidrorodamina (DHR) 123, kao bojenog reagensa-indikatora reakcije. Reakcija se očitava na protočnom citometru, koji analizira procenat ćelija koje su proizvele reaktivne oksidne radikale (koliko je ćelija izvršilo konverziju DHR 123 u Rodamin (R) 123), kao i njihov prosečan intenzitet fluorescencije (enzimska aktivnost, intenzitet i kvalitet reakcije tj. količinu R 123 po ćeliji).

4.2.7. Protočna citometrija

Protočna citometrija ja korišćena za procenu fagocitne sposobnosti neutrofilnih granulocita i respiratornog praska. Čelije su analizirane na uređaju za protočnu citometriju Guava Easy Cyte (Guava Technologies, Hayward, California, SAD).

Čelije su analizirane pomoću softvera Guava 4.4. U svim uzorcima je analizirano najmanje 10.000 čestica. Razdvajanje ćelija je posmatrano preko nekoliko dijagrama. Na prvom dijagramu su posmatrane ćelije sa crvenom fluorescencijom, čime smo isključili agregate bakterija koje imaju slične fizičke osobine veličinu i granuloznost nastalu usled agregacije, ali nemaju crvenu fluorescenciju.

Na sledećem dijagramu je praćeno razvrstavanje ćelije prema veličini, unutrašnjoj strukturi i granuloznosti. Granulociti se odlikuju srednjom veličinom i složenom granularnom građom (zauzimaju sredinu dijagrama). Limfociti su manji i kompaktnije strukture i na dijagramu se nalaze dole i levo, dok su monociti kao veće ćelije, a slične strukture, pozicionirani dole i desno.



Slika 4.1.

Odgovarajuće grupacije leukocita- razvrstavanje ćelija prema veličini i unutrašnjoj strukturi

Neutrofilni granulociti

Monociti

Limfociti

Kontrolni uzorci, odnosno uzorci bez stimulatora (i u jednoj i u drugoj reakciji), služe za određivanje graničnih vrednosti nulte reakcije. Čelije sa pozitivnom reakcijom fluoresciraju zelenim spektrom. Intenzitet zelene fluorescentne boje (potiče od reakcije Rodamina 123 ili ingestiranih *E. coli* obeleženih FITC-om) je kvantitativna i kvalitativna mera aktivnosti neutrofilnih granulocita. Kvalitet (jačina) respiratornog praska pojedinačnih ćelija u Phagoburst[®] testu, odnosno, broju fagocitovanih bakterija u Phagotestu[®] izražava se kroz srednju vrednost pozitivnih reakcija, odnosno, srednji intenzitet fluorescence (engl. *mean fluorescence intensity* - MIF) (obraćunato po Menge-u i saradnicima, 1998).

Umnožak procenta pozitivnih ćelija koje su reagovala fagocitozom odnosno respiratornim praskom i stepena njihovog intenziteta označava se kao indeks prosečne fagocitoze ili respiratornog praska:

$$\text{index} = [(\% \text{ pozitivne ćelije}) \times (\text{MIF}) / 100]$$

4.2.8. Kvalitativno određivanje aktivnosti mijeloperoksidaze u serumu

Dodatno, na 10 uzoraka krvi, u svih 7 termina, određena je aktivnost enzima mijeloperoksidaze. Primenjeni test se zasniva na takozvanom "sendvič" ELISA testu sa dvostrukim antitelima. U radu je korišćen komercijalni ELISA test kit (ELISA Kit for Myeloperoxidase (MPO), Cloud-clone Corp, SAD). Komercijalni kit sadrži mikrotitar ploču sa bazenčićima koji su obloženi antitelima specifičnim za mijeloperoksidazu. Nakon dodavanja standarda i uzoraka pripremljenih prema uputstvu proizvođača, antitela specifična za mijeloperoksidazu dodaju se u bazenčiće mikrotitar ploče, za koju je vezan biotin, a nakon inkubacije dodaje se peroksidaza rena za koju je vezan avidin. Dalji postupak podrazumeva dodavanje TMB supstratnog rastvora, koji će promeniti boju u onim bazenčićima koji sadrže mijeloperoksidazu. Antitelo konjugovano biotinom i enzim konjugovan avidinom u tim bazenčićima dovode do promene boje. Reakcija enzim-supstrat se završava dodavanjem rastvora sumporne kiseline („stop rastvor“) i promena boje se meri spektrofotometrijskim putem na ELISA čitaču Multiscan MCC/340 (Labsystem, Finska), na talasnoj dužini od 450 nm ± 10 nm. Koncentracija mijeloperoksidaze u uzorcima se zatim određuje upoređivanjem O.D. uzoraka na standardnoj krivi.

4.2.9. Ispitivanje uticaja različitih egzogenih faktora na funkcionalnu aktivnost neutrofilnih granulocita

Drugi deo ispitivanja je imao za cilj ispitivanje uticaja različitih egzogenih faktora (tri biljna ekstrakta i jedan antiseptik u različitim koncentracijama) na stepen fagocitne sposobnosti i respiratornog praska neutrofilnih granulocita iz uzoraka pune krvi kod 6 jedinki, odabranih metodom slučajnog izbora..

In vitro inkubacija ispitivanih biljnih ekstrakta i antiseptika vršena je u poslednjoj nedelji pred očekivani termin partusa i u prvoj nedelji nakon partusa. Etarska ulja i antiseptik, svaki u

dve različite koncentracije, inkubirani su u trajanju od 10 minuta, sa uzorkom pune krvi krave i određivana je fagocitna sposobnost neutrofilnih granulocita i izveden je ROS test:

- etarsko ulje nane (*Aetheroleum Mentha piperita L.*) - kod 6 životinja u 2 termina i 2 doze (24 uzorka po svakom testu - ukupno 48 uzoraka);
- etarsko ulje Rtanjskog čaja (čubra) (*Aetheroleum Satureja montana L.*) - kod 6 životinja u 2 termina i 2 doze (24 uzorka po svakom testu - ukupno 48 uzoraka);
- etarsko ulje timijana - majčina dušica (*Aetheroleum Thymii*) - kod 6 životinja u 2 termina i 2 doze (24 uzorka po svakom testu - ukupno 48 uzoraka);
- Armenicum[®] - kod 6 životinja u 2 termina i 2 doze (24 uzorka po svakom testu - ukupno 48 uzoraka).

Koncentracije etarskih ulja i antiseptika koje smo koristili dobijene su na osnovu rezultata naših prethodnih istraživanja (neobjavljeni podaci). Korišćene su sledeće koncentracije etarskih ulja: 0,05% Rtanjski čaj (R2) i 0,025% Rtanjski čaj (R3); 0,1% menta (M1) i 0,05% menta (M2); 0,025% timijan (T3) i 0,0125% timijan (T4). Armenicum[®] je razređen 1:800 (A4) i 1:1600 (A5).

U ovim ispitivanjima je bio primenjen metod auto kontrole, jer su uzorci krvi od svih grla, u ovim posmatranim terminima bili podeljeni u dve grupe. U prvoj grupi uzoraka krvi vršena je inkubacija sa 20µl ispitivane supstance (biljni ekstrakt/antiseptik), a u drugoj grupi uzoraka- inkubacija je vršena sa fiziološkim rastvorom, u istoj zapremini (autokontrola).

4.2.9.1. Priprema rastvora etarskih ulja

Za pripremu rastvora etarskih ulja korišćeni su dimetil sulfoksid (DMSO) i fiziološki rastvor. DMSO je prvobitno testiran i ustanovljeno je da je neutralan zbog toga što nije imao ni inhibitorno ni stimulatívno dejstvo na funkcije neutrofilnih granulocita. Osnovni ili štok rastvor za etarska ulja pripremljen je u sledećem odnosu: 400µl DMSO i 100µl odgovarajućeg etarskog ulja, pri čemu je dobijen 20% rastvor etarskog ulja. Nakon mešanja na Vorteks mešalici, štok rastvor je čuvan u frižideru do momenta analize, u tamnoj ambalaži, zaštićen od svetla, na temperaturi od 4 do 8°C.

Dalja razređenja su pripremana sa fiziološkim rastvorom u sledećim koracima:

1. Koncentracija od 1% dobijena je tako što je u 950 μ l fiziološkog rastvora dodato 50 μ l štok rastvora odgovarajućeg etarskog ulja (radni rastvor R0).
2. Koncentracija od 0,1% dobijena je tako što je u 900 μ l fiziološkog rastvora dodato 100 μ l 1% rastvora (radni rastvor R0) odgovarajućeg etarskog ulja (radni rastvor R1).
3. Koncentracija od 0,05% dobijena je tako što je u 950 μ l fiziološkog rastvora dodato 50 μ l radnog rastvora R0 odgovarajućeg etarskog ulja (radni rastvor R2).
4. Koncentracija 0,025% je dobijena tako što je u 975 μ l fiziološkog rastvora dodato 25 μ l radnog rastvora R2 odgovarajućeg etarskog ulja (radni rastvor R3).
5. Koncentracija 0,0125% dobijena je tako što je u 750 μ l fiziološkog rastvora dodato 250 μ l radnog rastvora R2 odgovarajućeg etarskog ulja (radni rastvor R4).

4.2.9.2. Priprema rastvora antiseptika za ogled:

Tokom pripreme antiseptika Armenicum[®] za ogled, korišćena su dvostruka razređenja u fiziološkom rastvoru (od 1:100 do 1:1600). Radni rastvor A1 od koga su pravljena dalja dvostruka razređenja je bio 1:100. On je bio pripremljen dodavanjem 10 μ l Armenicum[®] u 990 μ l fiziološkog rastvora. Nakon mešanja na Vorteks mešalici pravljena su sledeća razređenja: 500 μ l radnog rastvora A1 preneto je u Eppendorf epruvetu sa 500 μ l fiziološkog rastvora i dobijen je radni rastvor A2 (1:200). Nakon mešanja na Vorteks mešalici preneto je 500 μ l u sledeću Eppendorf epruvetu sa istom zapreminom fiziološkog rastvora. Postupak je nastavljen do razblaženja 1:1600. Razblaženja koja su korišćena u ogledu su bila: radni rastvor A4 (1:800) i radni rastvor A5 (1:1600).

4.2.10. Statistička obrada podataka

U statističkoj analizi dobijenih rezultata kao osnovne statističke metode korišćeni su deskriptivni statistički pokazatelji (mere centralne tendencije, standardna devijacija, standardna greška aritmetičke sredine, interkvartilna razlika, interval varijacije i koeficijent varijacije). Dalja statistička analiza odvijala se u zavisnosti od toga da li su analizirani podaci

bili normalno distribuirani ili ne. Testiranje na normalnost izvedeno je pomoću Kolmogorov-Smirnov testa. U slučaju normalne distribucije podataka, za poređenje signifikantnih razlika između srednjih vrednosti u različitim terminima korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (One way analysis of variances). U slučaju kada podaci nisu bili normalno distribuirani upotrebljena je Kruskal-Valisova analiza varijanse (Kruskal Wallis Analysis of Variance on Ranks). U slučaju da postoje statistički signifikantne razlike između termina, parovi termina su poređeni između sebe na osnovu parametarskog Takijevog testa (Tukey's test), odnosno ne-parametrijskog Dunn's Multiple Comparison testa. Takođe je primenjivana i faktorska analiza u dokazivanju funkcionalnosti neutrofilnih granulocita. Značajnost razlika ustanovljena je na nivoima značajnosti od 5 i 1%. Statistička analiza izvedenog eksperimenta urađena je pomoću softvera GrapfPad Prism version 5.00 za Windows (GrapfPad Software, San Diego, California, USA) i MS Excel-u.

5. REZULTATI

U skladu sa postavljenim ciljevima i zadacima i radi veće preglednosti, rezultati dobijeni ispitivanjima izvedenim u okviru ove disertacije podjeljeni su u podpoglavlja. Rezultati su predstavljani i tabelarno i grafički.

U tabelama su korišćene sledeće skraćenice: n – ukupan broj jedinki, X srednja aritmetička vrednost, SD – standardna devijacija, Sy – standardna greška, CV (%) - koeficijent varijacije, X max – maksimalna srednja vrednost, X min – minimalna srednja vrednost, Me – medijana i IQR- interkvartilna razlika. Ukoliko nije drugačije navedeno, za određivanje statističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima je korišćena jednofaktorska analiza varijanse (One way analysis of variances).

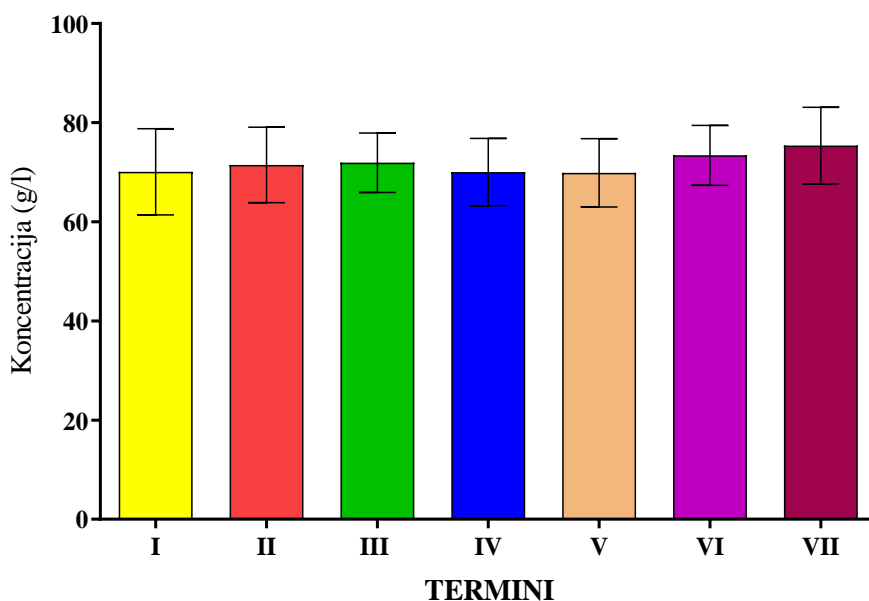
5.1. Vrednosti metaboličkih parametara

U tabeli 5.1.1. prikazani su deskriptivni statistički parametru koncentracije ukupnih proteina u krvnom serumu ispitivanih krava (g/l).

Tabela 5.1.1. Koncentracija ukupnih proteina u krvnom serumu ispitivanih krava (g/l)

Termini	Nedelje do/od teljenja	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	70,10	8,70	1,90	12,42	85,31	50,97
II	-2	21	71,48	7,62	1,66	10,65	79,40	52,03
III	-1	21	71,91	5,98	1,30	8,31	80,35	60,88
IV	+1	21	70,04	6,79	1,48	9,69	80,79	58,06
V	+2	21	69,87	6,89	1,50	9,86	82,10	59,82
VI	+3	21	73,41	6,04	1,32	8,23	84,20	57,30
VII	+6	21	75,37	7,72	1,68	10,25	90,97	66,90

Radi bolje preglednost, ovi rezultati su prikazani i grafički.



Grafikon 5.1.1a: Prosečne vrednosti koncentracije proteina (g/l) i standardne devijacije (SD) u krvnom serumu krava u peripartalnom periodu u sedam termina ispitivanja

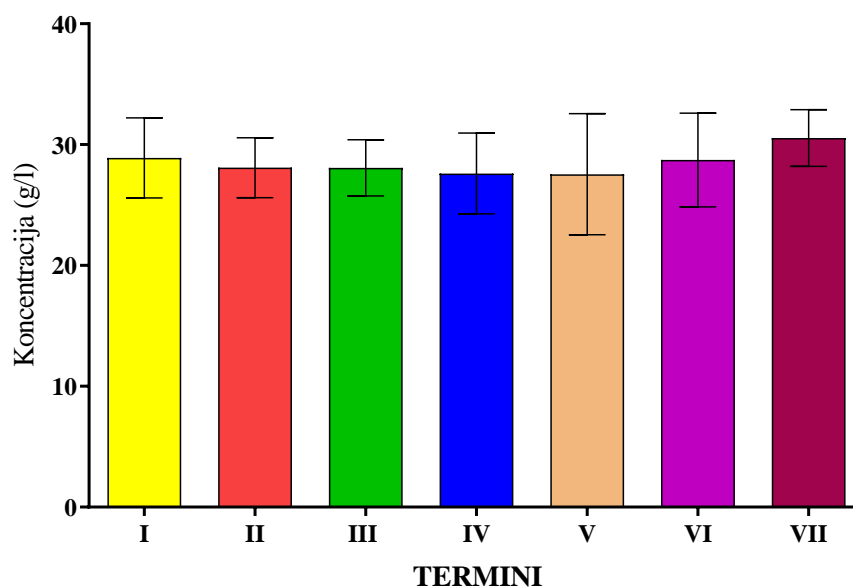
Analizom vrednosti koncentracije ukupnih proteina u krvi mlečnih krava ustanovljena je najmanja prosečna koncentracija u drugoj nedelji ($69,87 \pm 6,89$ g/l), a najveća u šestoj nedelji nakon teljenja ($75,37 \pm 7,72$ g/l). Između srednjih vrednosti registrovanih u pojedinim terminima nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$). Variranje vrednosti ovog parametra nije bilo izraženo, tako da je najveći koeficijent varijacije zabeležen u trećoj nedelji pre (12,42%), a najmanji je u trećoj nedelji nakon teljenja (8,23%).

Deskriptivni statistički parametri koji se odnose na koncentraciju albumina u krvnom serumu ispitivanih mlečnih krava prikazani su u tabeli 5.1.2.

Tabela 5.1.2. Koncentracija albumina u krvnom serumu mlečnih krava (g/l)

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	28,90	3,32	0,72	11,47%	35,50	23,33
II	-2	21	28,09	2,48	0,54	8,82%	33,70	22,26
III	-1	21	28,08	2,32	0,50	8,25%	31,80	23,98
IV	1	21	27,61	3,34	0,73	12,10%	35,70	22,50
V	2	21	27,54	5,01	1,09	18,19%	45,50	20,31
VI	3	21	28,73	3,87	0,84	13,48%	37,44	22,00
VII	6	21	30,55	2,35	0,51	7,70%	34,80	26,00

Grafički prikaz rezultata predstavljenih u tabeli dat je na grafikonu 5.1.2a:



Grafikon 5.1.2a.: Prosečne vrednosti koncentracije albumina (g/l) i standardne devijacije (SD) u krvnom serumu krava u peripartalnom periodu u sedam termina ispitivanja

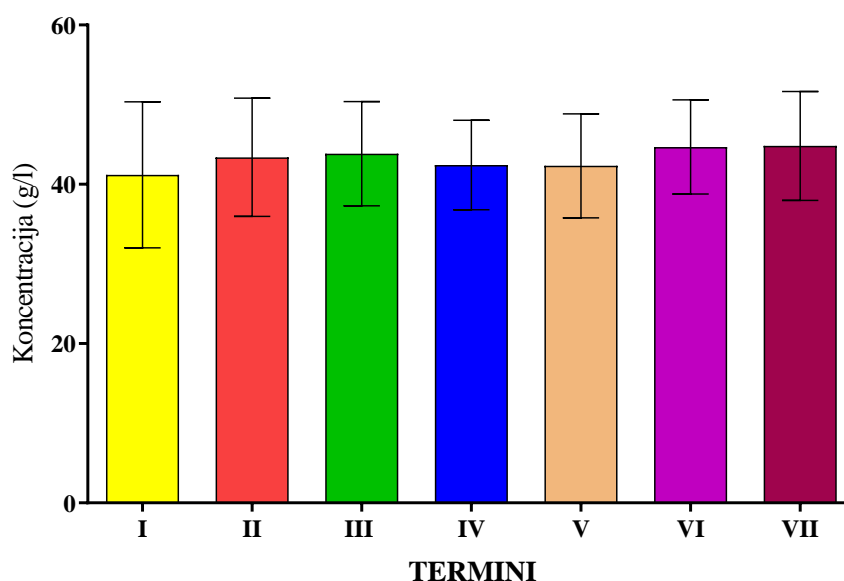
Najmanja prosečna koncentracija albumina u krvnom serumu mlečnih krava, uključenih u ova ispitivanja, registrovana je u drugoj nedelji nakon teljenja ($27,54 \pm 5,01$ g/l), a najveća u šestoj nedelji nakon teljenja ($30,55 \pm 2,35$ g/l). Statističkom analizom nisu ustanovljene signifikantne razlike u odnosu na termine ispitivanja ($p > 0,05$). Najveći koeficijent varijacije (18,19%) zabeležen je u drugoj nedelji posle, a najmanji u šestoj nedelji nakon teljenja (7,70%).

U tabeli 5.1.3. su prikazani deskriptivni statistički parametri dobijeni određivanjem koncentracije globulina u krvnom serumu ispitivanih mlečnih krava.

Tabela 5.1.3. Koncentracija globulina u krvnom serumu goveda (g/l)

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	41,20	9,17	2,00	22,25	61,98	22,47
II	-2	21	43,39	7,42	1,62	17,10	53,16	23,27
III	-1	21	43,84	6,53	1,43	14,90	52,38	31,12
IV	1	21	42,43	5,62	1,23	13,25	50,80	28,86
V	2	21	42,32	6,52	1,423	15,41	54,43	30,92
VI	3	21	44,68	5,90	1,29	13,21	57,65	33,53
VII	6	21	44,82	6,85	1,49	15,28	56,30	34,50

Radi bolje preglednosti, rezultati iz tabele su predstavljani i grafički.



Grafikon 5.1.3a.: Prosečne vrednosti koncentracije globulina (g/l) i standardne devijacije (SD) u krvnom serumu krava u peripartalnom periodu u sedam termina ispitivanja

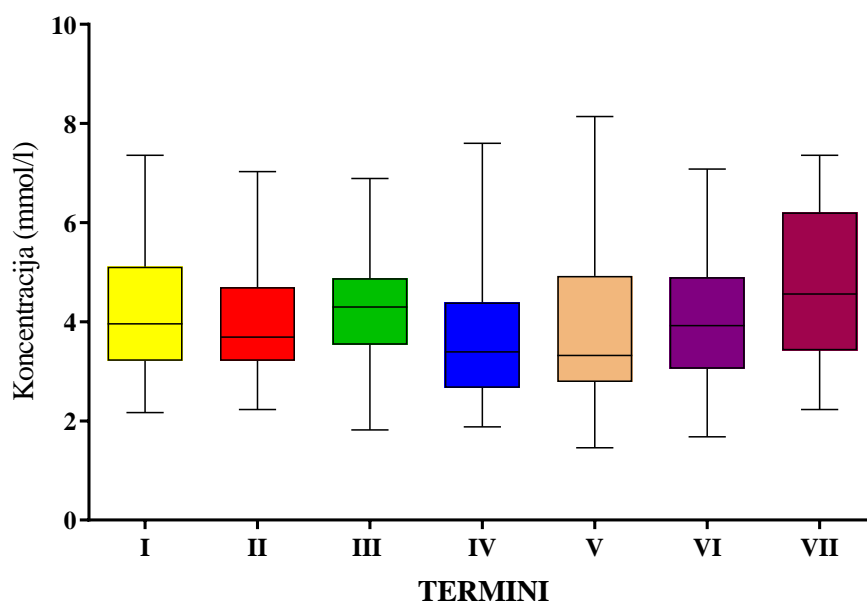
Najveća prosečna koncentracija globulina u krvi ispitivanih krava registrovana je u šestoj nedelji nakon teljenja ($44,82 \pm 6,85$ g/l), a najmanja u trećoj nedelji pre teljenja ($41,20 \pm 9,17$ g/l). Statističkom analizom ovog parametra nisu ustanovljene signifikantne razlike između srednjih vrednosti u odnosu na termine ispitivanja ($p > 0,05$). Najveći koeficijent varijacije je registrovan u trećoj nedelji pre teljenja (22,25%), a najmanji u trećoj nedelji nakon teljenja (13,21%).

Deskriptivni statistički parametri koji se odnose na koncentraciju uree u krvnom serumu ispitivanih mlečnih krava prikazani su u tabeli 5.1.4.

Tabela 5.1.4. Koncentracija uree u krvnom serumu mlečnih krava (mmol/l)

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	3,96	1,90	0,29	30,71	7,36	2,17
II	-2	21	3,69	1,49	0,24	27,08	7,03	2,23
III	-1	21	4,30	1,35	0,26	29,14	6,89	1,82
IV	1	21	3,39	1,73	0,30	37,16	7,60	1,88
V	2	21	3,32	2,14	0,36	43,05	8,14	1,46
VI	3	21	3,92	1,85	0,30	34,79	7,08	1,68
VII	6	21	4,56	2,78	0,34	32,10	7,36	2,23

Rezultati iz tabele predstavljeni su i grafički.



Grafikon 5.1.4a.: Prosečne vrednosti koncentracije uree (mmol/l) i interkvartilne razlike (IQR) u krvnom serumu krava u peripartalnom periodu u sedam termina ispitivanja

Analizirajući vrednosti za parametar urea, prosečna koncentracija je bila najmanja u drugoj nedelji nakon teljenja ($3,32 \pm 2,14$ mmol/l), a najveća u šestoj nedelji nakon teljenja ($4,56 \pm 2,78$ mmol/l). Statističkom analizom ovog parametra nisu ustanovljene signifikantne razlike u odnosu na termine ispitivanja ($p > 0,05$). Najveći koeficijent varijacije je zabeležen u drugoj nedelji nakon teljenja (43,05%), a najmanji u drugoj nedelji pre teljenja (27,08%). Zbog visokih vrednosti koeficijenata varijacija, u statističkoj analizi su primenjivani neparametrijski testovi.

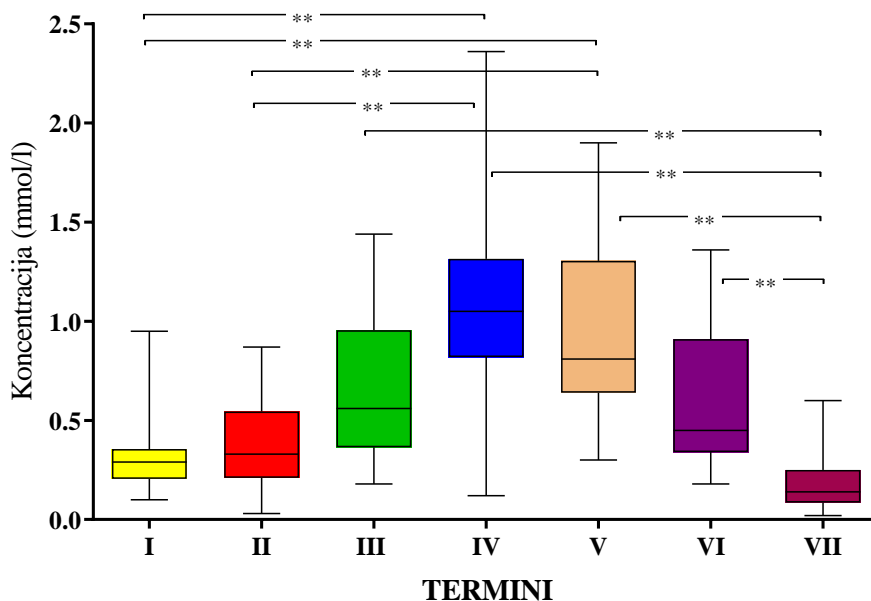
U tabeli 5.1.5. su prikazani deskriptivni statistički parametri dobijeni određivanjem koncentracije neesterifikovanih masnih kiselina (NEMK) u krvnom serumu ispitivanih mlečnih krava.

Tabela 5.1.5. Koncentracija neesterifikovanih masnih kiselina (NEMK) u krvnom serumu mlečnih krava (mmol/l)

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	0,29 ^{xy}	0,15	0,04	58,35	0,95	0,10
II	-2	21	0,33 ^{zq}	0,34	0,05	57,81	0,87	0,03
III	-1	21	0,56 ^w	0,59	0,09	58,68	1,44	0,18
IV	1	21	1,05 ^{xzr}	0,50	0,12	51,18	2,36	0,12
V	2	21	0,81 ^{yqt}	0,67	0,09	45,97	1,90	0,30
VI	3	21	0,45 ^u	0,57	0,07	56,85	1,36	0,18
VII	6	21	0,14 ^{wrtu}	0,17	0,03	72,61	0,60	0,02

Ista mala slova x, y, z, q, w, r, t, u, pokazuju signifikantnu razliku, $p < 0,01$;

Grafički prikaz rezultata predstavljenih u tabeli, jasno ukazuje na razlike između pojedinih termina.



Grafikon 5.1.5a.: Prosečne vrednosti koncentracije NEMK (mmol/l), interkvartilne razlike (IQR) u krvnom serumu krava u peripartalnom periodu u sedam termina ispitivanja ** $p < 0,01$

Najmanja prosečna koncentracija NEMK je registrovana u šestoj nedelji nakon teljenja ($0,14 \pm 0,17$ mmol/l) i bila je signifikantno manja ($p < 0,01$) u odnosu na koncentracije u prvoj nedelji pre teljenja, kao i u odnosu na koncentracije u ostalim terminima nakon teljenja. Najviša prosečna koncentracija NEMK je registrovana u prvoj nedelji nakon teljenja ($1,05 \pm 0,50$ mmol/l). Na grafičkom prikazu se jasno uočavaju statistički značajne razlike ($p < 0,01$) između vrednosti u prvoj i drugoj nedelji nakon teljenja u odnosu na drugu nedelju pre teljenja i u odnosu na treću nedelju pre teljenja. Analizirajući vrednosti za parametar NEMK, ustanovljena su izuzetno velika variranja i zbog toga su primenjeni neparametrijski testovi. Koeficijent varijacije je bio najveći u šestoj nedelji posle teljenja (72,61%), a najmanji u drugoj nedelji nakon teljenja (45,97%).

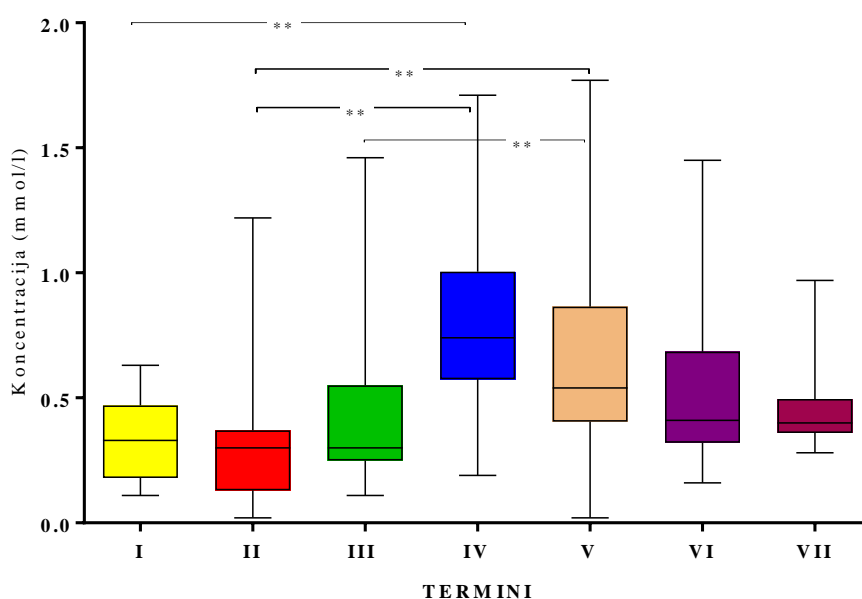
U tabeli 5.1.6. su prikazani deskriptivni statistički parametri dobijeni određivanjem koncentracije β -hidroksi-butilata (BHB) u krvnom serumu ispitivanih mlečnih krava.

Tabela 5.1.6. Koncentracija BHB u krvnom serumu mlečnih krava (mmol/l)

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	0,33 ^x	0,29	0,04	50,78	0,63	0,11
II	-2	21	0,30 ^{yz}	0,24	0,06	89,31	1,22	0,02
III	-1	21	0,30 ^q	0,30	0,07	71,08	1,46	0,11
IV	1	21	0,74 ^{xy}	0,43	0,087	45,65	1,71	0,19
V	2	21	0,54 ^{zq}	0,46	0,09	62,67	1,77	0,02
VI	3	21	0,41	0,37	0,07	58,90	1,45	0,16
VII	6	21	0,40	0,14	0,04	37,16	0,97	0,28

Ista mala slova x, y, z, q, ukazuju na signifikantnu razliku, $p < 0,01$;

Radi bolje preglednosti, rezultati merenja su prikazani i grafički.



Grafikon 5.1.6a.: Prosečne vrednosti koncentracije BHB (mmol/l), interkvartilne razlike (IQR) u krvnom serumu krava u peripartalnom periodu u sedam termina ispitivanja $**p < 0,01$

Najmanja prosečna koncentracija BHB registrovana je u drugoj i prvoj nedelji pre teljenja ($0,30 \pm 0,24$ i $0,30 \pm 0,30$ mmol/l). Prosečna koncentracija u prvoj nedelji nakon teljenja je bila statistički signifikantno veća ($p < 0,01$) u odnosu na prosečne koncentracije u trećoj i drugoj nedelji pre teljenja. Najveća prosečna koncentracija za parametar BHB je registrovana u prvoj nedelji nakon teljenja ($0,74 \pm 0,43$ mmol/l). Značajne razlike ($p < 0,01$) ustanovljene su između vrednosti u drugoj nedelji posle teljenja u odnosu na drugu i prvu nedelju pre teljenja. Najveći koeficijent varijacije je zabeležen u drugoj nedelji pre teljenja (89,31%), a najmanji u šestoj nedelji nakon teljenja (37,16%). Zbog toga su u statističkoj analizi primenjivani neparametrijski testovi.

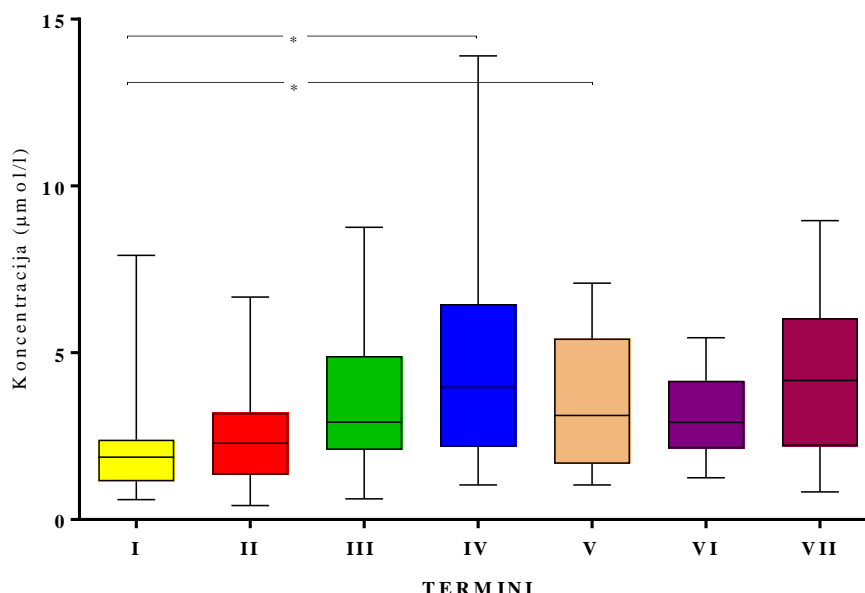
Deskriptivni statistički parametri za koncentraciju bilirubina u krvnom serumu mlečnih krava uključenih u ispitivanja prikazani su u tabeli 5.1.7.

Tabela 5.1.7. Koncentracija bilirubina u krvnom serumu mlečnih krava ($\mu\text{mol/l}$)

Termini Uzorkovanja	Nedelje Do/Od Teljenja	N	Me	IQR	Sy	CV (%)	X Max	X Min
I	-3	1,87	1,87 ^{ab}	1,15	0,46	86,56	7,92	0,60
II	-2	2,29	2,29	1,35	0,31	59,50	6,67	0,42
III	-1	2,92	2,92	2,09	0,46	59,62	8,76	0,62
IV	1	3,96	3,96 ^a	2,19	0,66	64,76	13,90	1,04
V	2	3,12	3,12	1,67	0,43	55,80	7,09	1,04
VI	3	2,91	2,91 ^b	2,13	0,26	37,32	5,45	1,25
VII	6	4,17	4,17	2,20	0,50	53,81	8,96	0,83

Ista mala slova a, b ukazuju na signifikantnu razliku, $p < 0,05$;

Dobijeni rezultati su prikazani i grafički.



Grafikon 5.1.7a.: Prosečne vrednosti koncentracije bilirubina ($\mu\text{mol/l}$) u krvnom serumu krava i interkvartilne razlike (IQR) u peripartalnom periodu u sedam termina ispitivanja * $p < 0,05$

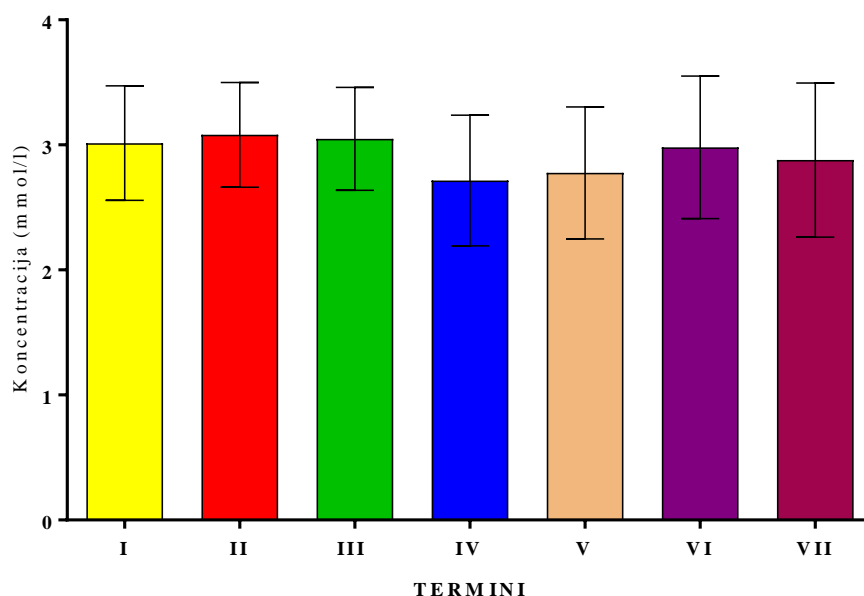
Najveća prosečna koncentracija bilirubina je zabeležena u šestoj nedelji nakon teljenja ($4,17 \pm 2,20 \mu\text{mol/l}$). Najmanja prosečna koncentracija registrovana je u trećoj nedelji pre teljenja ($1,87 \pm 1,15 \mu\text{mol/l}$) i ona je bila statistički signifikantno manja ($p < 0,05$) u odnosu na prosečne koncentracije u prvoj i trećoj nedelji nakon teljenja. Najveći koeficijent varijacije je utvrđen u trećoj nedelji pre teljenja (86,56%), a najmanji u trećoj nedelji nakon teljenja (37,32%) i zbog toga su primenjivani statistički neparametrijski testovi.

U tabeli 5.1.8. su prikazani deskriptivni statistički parametri dobijeni određivanjem koncentracije glukoze u krvnom serumu ispitivanih mlečnih krava.

Tabela 5.1.8. Koncentracija glukoze u krvnom serumu mlečnih krava (mmol/l)

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	3,01	0,46	0,10	15,20	3,71	2,24
II	-2	21	3,08	0,42	0,09	13,57	3,83	1,83
III	-1	21	3,05	0,41	0,09	13,50	4,06	2,02
IV	1	21	2,72	0,52	0,11	19,24	3,74	1,76
V	2	21	2,78	0,53	0,11	19,03	3,84	2,04
VI	3	21	2,98	0,57	0,12	19,13	3,79	1,91
VII	6	21	2,88	0,62	0,13	21,42	4,24	1,66

Radi bolje preglednosti, dobijeni rezultati su prikazani i grafički.



Grafikon 5.1.8a.: Prosečne vrednosti koncentracije glukoze u krvnom serumu krava (mmol/l) i standardne devijacije (SD) u peripartalnom periodu u sedam termina ispitivanja

Analizirajući vrednosti za koncentraciju glukoze, ustanovljeno je da je najmanja prosečna koncentracija bila u prvoj nedelji nakon teljenja ($2,72 \pm 0,52$ mmol/l), a najveća u drugoj nedelji pre teljenja ($3,08 \pm 0,42$ mmol/l). Statističkom analizom ovog parametra nisu ustanovljene signifikantne razlike između srednjih vrednosti u odnosu na termine ispitivanja ($p > 0,05$). Najveći koeficijent varijacije je zabeležen u šestoj nedelji nakon teljenja (21,42%), a najmanji u prvoj nedelji pre teljenja (13,50%).

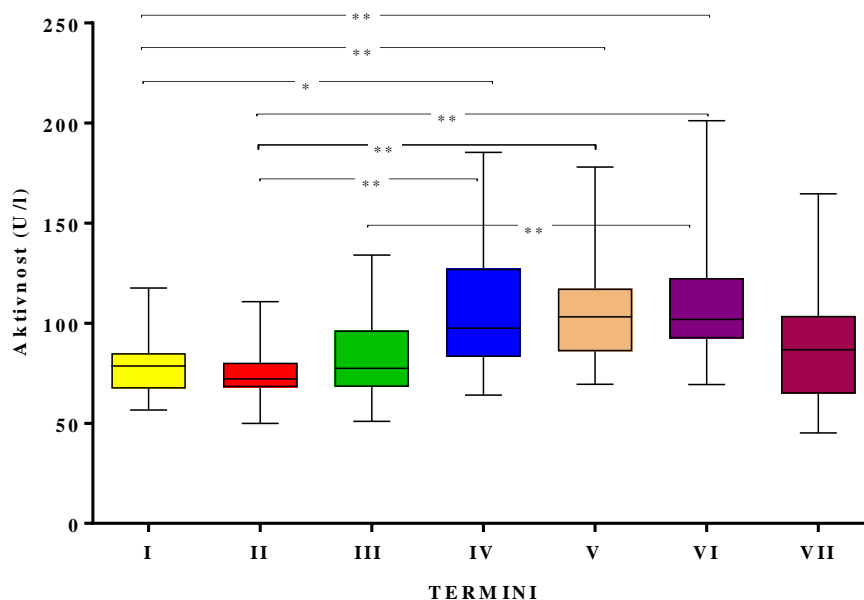
Deskriptivni statistički parametri koji se odnose na aktivnost aspartat-aminotransferaze (AST) u krvnom serumu ispitivanih mlečnih krava prikazani su u tabeli 5.1.9.

Tabela 5.1.9. Aktivnost aspartat-aminotransferaze (AST) u krvnom serumu mlečnih krava (U/l)

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	78,60 ^{axy}	17,72	2,93	17,22	117,60	56,70
II	-2	21	72,20 ^{zqw}	12,26	3,08	18,63	110,80	50,00
III	-1	21	77,50 ^r	28,15	4,36	24,21	134,10	51,02
IV	1	21	97,50 ^{az}	44,14	7,35	31,62	185,40	64,11
V	2	21	103,20 ^{xq}	31,42	5,78	25,22	178,10	69,56
VI	3	21	101,90 ^{ywr}	30,34	6,21	25,95	201,20	69,42
VII	6	21	86,73	38,90	6,36	32,11	164,70	45,20

Ista mala slova x, y, z, q, w, r, ukazuju na signifikantnu razliku, $p < 0,01$; malo slovo a signifikantna razlika $p < 0,05$

Rezultati su radi bolje preglednosti prikazani na grafikonu 5.1.9a.



Grafikon 5.1.9a.: Prosečne vrednosti aktivnosti AST (U/l) i interkvartilne razlike (IQR) u krvnom serumu krava u peripartalnom periodu u sedam termina ispitivanja * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$

Najmanja prosečna aktivnost AST je zabeležena u drugoj nedelji pre teljenja ($72,20 \pm 12,26$ U/l). Ona je bila statistički značajno manja ($p < 0,01$) u odnosu na vrednosti u prva tri termina nakon teljenja. Najveća prosečna aktivnost AST registrovana je u drugoj nedelji posle teljenja ($103,20 \pm 31,42$). Aktivnost u trećoj nedelji pre teljenja je bila statistički signifikantno manja ($p < 0,01$) u odnosu na prosečnu aktivnost u drugoj i trećoj nedelji nakon teljenja. Signifikantne razlike registrovane su i između prve nedelje pre teljenja i treće nedelje nakon teljenja ($p < 0,01$), i između treće nedelje pre teljenja i prve nedelje nakon teljenja ($p < 0,05$). Najveći koeficijent varijacije je uočen u šestoj nedelji nakon teljenja (32,11%), a

najmanji u trećoj nedelji pre teljenja (17,22%). Zbog velikih variranja u vrednostima, za ovaj parametar su primenjeni neparametrijski testovi.

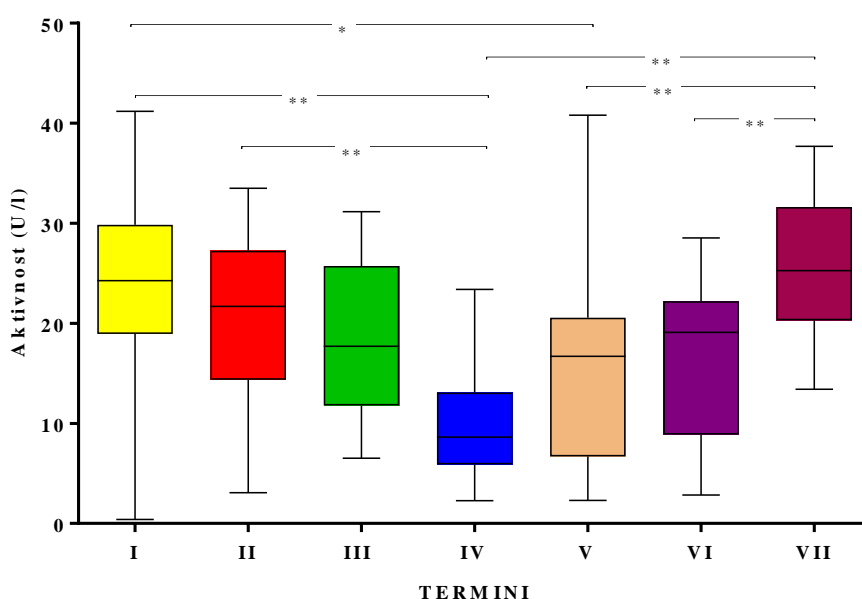
U tabeli 5.1.10. su prikazani deskriptivni statistički parametri dobijeni određivanjem aktivnosti alanin aminotransferaze u krvnom serumu ispitivanih mlečnih krava.

Tabela 5.1.10. Aktivnost alanin aminotransferaze (ALT) u krvnom serumu mlečnih krava (U/l)

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	24,27 ^{ax}	10,91	1,88	35,65	41,20	0,40
II	-2	21	21,70 ^y	12,88	1,78	39,44	33,50	3,07
III	-1	21	17,70	13,93	1,66	41,41	31,15	6,51
IV	1	21	8,64 ^{xyz}	7,18	1,38	61,19	23,40	2,28
V	2	21	16,70 ^{aq}	13,87	2,13	60,94	40,80	2,30
VI	3	21	19,10 ^w	13,33	1,71	47,44	28,54	2,83
VII	6	21	25,28 ^{zqw}	11,33	1,46	26,10	37,70	13,41

Ista mala slova x, y, z, q, w, ukazuju na signifikantnu razliku, $p < 0,01$; malo slovo a, signifikantna razlika $p < 0,05$

Rezultati su radi bolje preglednosti prikazani i grafikonom.



Grafikon 5.1.10a. Prosečne vrednosti aktivnosti ALT (U/l) i interkvartilne razlike (IQR) u krvnom serumu krava u peripartalnom periodu u sedam termina ispitivanja * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$

Najveća prosečna aktivnost ALT je registrovana u šestoj nedelji nakon teljenja (25,28±11,33 U/l) i bila je statistički je signifikantno veća ($p < 0,01$) u odnosu na prosečne aktivnosti u ostalim terminima nakon teljenja. Najniža aktivnost ALT je utvrđena u prvoj nedelji nakon teljenja (8,64±7,18 U/l) i ona je bila statistički značajno manja ($p < 0,01$) u odnosu na drugu i treću nedelju pre teljenja. Između treće nedelje pre teljenja i druge nedelje nakon teljenja, kao i između treće i šeste nedelje nakon teljenja uočena je statistički

signifikantna razlika ($p < 0,05$). Analizirajući vrednosti za parametar ALT, registrovana su izuzetno velika variranja i zbog toga su primenjeni neparametrijski testovi. Najveći koeficijent varijacije je bio zabeležen u prvoj nedelji nakon teljenja (61,19%), a najmanji u šestoj nedelji posle teljenja (26,10%).

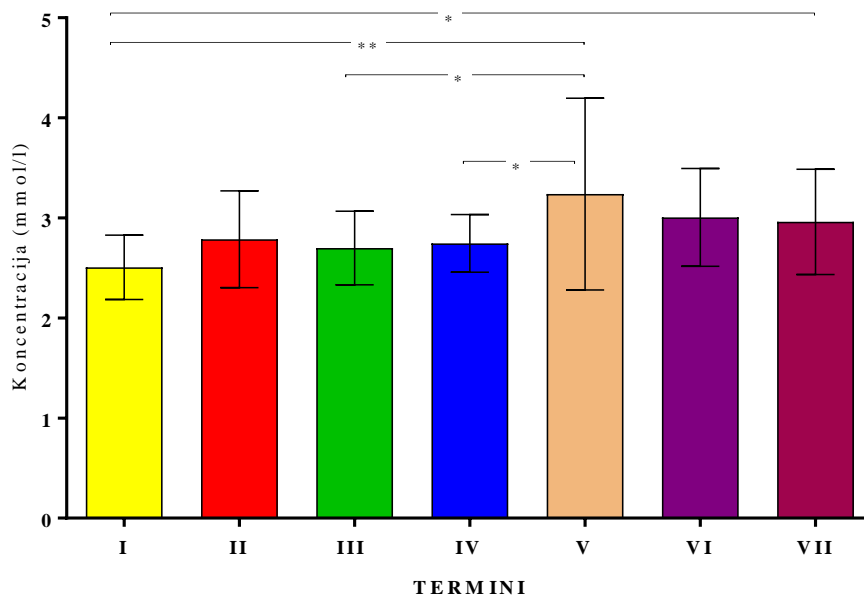
Deskriptivni statistički parametri izračunati posle određivanja koncentracije kalcijuma u krvnom serumu ispitivanih mlečnih krava prikazani su u tabeli 5.1.11.

Tabela 5.1.11. Koncentracija kalcijuma u krvnom serumu mlečnih krava (mmol/l)

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	2,51 ^{xa}	0,32	0,07	12,81	3,22	1,70
II	-2	21	2,79	0,48	0,10	17,36	4,17	1,95
III	-1	21	2,70 ^b	0,37	0,08	13,62	3,56	2,21
IV	1	21	2,75 ^c	0,29	0,06	10,50	3,39	2,34
V	2	21	3,24 ^{abc}	0,96	0,21	29,60	5,63	2,40
VI	3	21	3,01 ^a	0,49	0,11	16,27	3,79	2,19
VII	6	21	2,96	0,53	0,11	17,76	3,95	2,23

Ista mala slova a, b, c, d pokazuju signifikantnu razliku za $p < 0,05$; x signifikantna razlika za $p < 0,01$

Grafički prikaz rezultata predstavljenih u tabeli, jasno ukazuje na razlike između pojedinih termina.



Grafikon 5.1.11a. Prosečne vrednosti koncentracije kalcijuma (mmol/l) i standardne devijacije (SD) u krvnom serumu krava u peripartalnom periodu u sedam termina ispitivanja * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$

Najveća prosečna koncentracija kalcijuma u krvnom serumu mlečnih krava utvrđena je u drugoj nedelji nakon teljenja ($3,24 \pm 0,96$ mmol/l). Ona je bila statistički značajno veća ($p < 0,01$) u odnosu na prosečne koncentracije u trećoj nedelji pre teljenja, a u odnosu na

prosečne koncentracije u prvoj nedelji pre teljenja i u prvoj nedelji nakon teljenja signifikantno veća ($p < 0,05$). Najmanja prosečna koncentracija kalcijuma je iznosila $2,51 \pm 0,32$ mmol/l i registrovana je u trećoj nedelji pre teljenja. Signifikantna razlika ($p < 0,05$) ustanovljena je još i u uzorcima seruma dobijenim u trećoj nedelji pre i trećoj nedelji nakon teljenja. Između vrednosti dobijenih u ostalim terminima nije ustanovljena signifikantna razlika ($p > 0,05$). Koeficijent varijacije je bio najveći u drugoj nedelji (29,60%), a najmanji u prvoj nedelji nakon teljenja (10,50%).

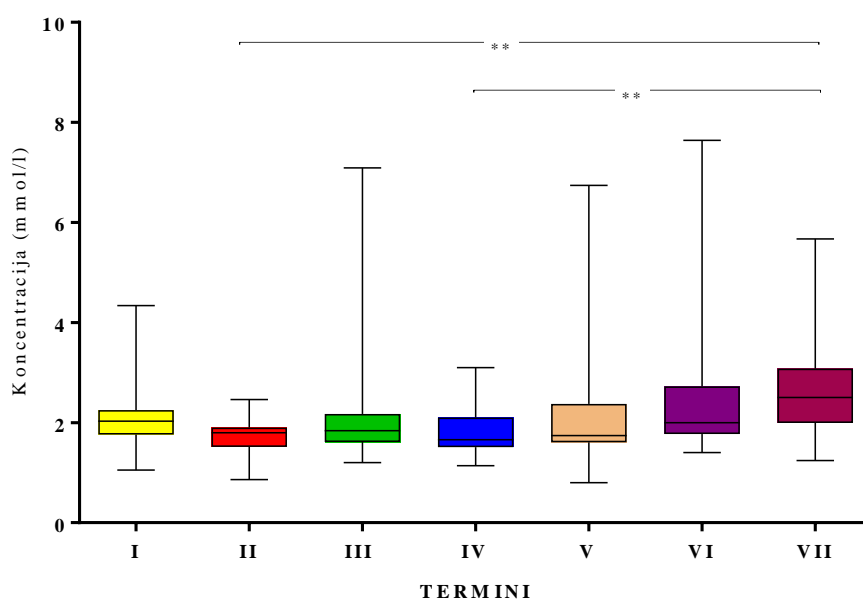
Deskriptivni statistički parametri za koncentraciju fosfora u krvnom serumu mlečnih krava uključenih u ispitivanja prikazani su u tabeli 5.1.12.

Tabela 5.1.12. Koncentracija fosfora u krvnom serumu goveda (mmol/l)

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	2,03	0,49	0,15	32,16	4,34	1,05
II	-2	21	1,80 ^x	0,39	0,08	21,25	2,46	0,86
III	-1	21	1,84	0,56	0,27	56,70	7,09	1,20
IV	1	21	1,66 ^y	0,59	0,117	27,93	3,10	1,14
V	2	21	1,74	0,77	0,30	59,31	6,74	0,80
VI	3	21	2,00	0,96	0,28	54,39	7,64	1,40
VII	6	21	2,50 ^{xy}	1,09	0,23	39,16	5,67	1,24

Ista mala slova x, y, ukazuju na signifikantnu razliku, $p < 0,01$

Rezultati za koncentraciju fosfora u krvnom serumu, radi bolje preglednosti su prikazani i grafikonom.



Grafikon 5.1.12a. Prosečne vrednosti koncentracije fosfora (mmol/l) i interkvartilne razlike (IQR) u krvnom serumu krava u peripartalnom periodu u sedam termina ispitivanja; ** $p < 0,01$

Analizom koncentracije fosfora u krvnom serumu ustanovljena je najmanja prosečna vrednost ovog parametra u prvoj nedelji nakon teljenja ($1,66 \pm 0,59$ mmol/l), a najveća u šestoj nedelji nakon teljenja ($2,50 \pm 1,09$ mmol/l). Ona je bila signifikantno veća ($p < 0,01$) u odnosu na prosečne koncentracije u drugoj nedelji pre teljenja i prvoj nedelji nakon teljenja. Između srednjih vrednosti registrovanih u ostalim terminima nije ustanovljena signifikantna razlika ($p > 0,05$). Variranje vrednosti ovog parametra je bilo izuzetno veliko, tako da su za statističke analize korišćeni neparametrijski testovi. Koeficijent varijacije je bio najveći u drugoj nedelji nakon ($59,31\%$), a najmanji u drugoj nedelji pre teljenja ($21,25\%$).

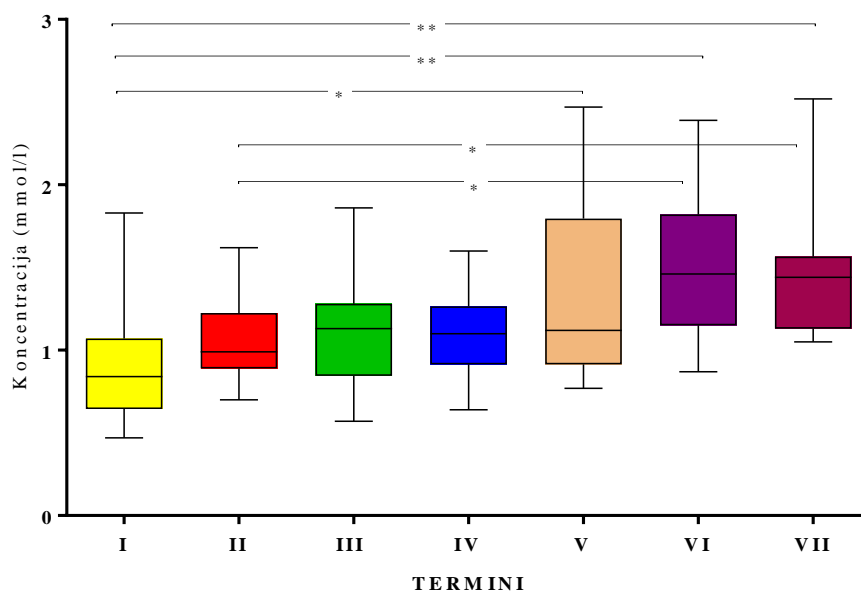
U tabeli 5.1.13. su prikazani deskriptivni statistički parametri dobijeni određivanjem koncentracije magnezijuma u krvnom serumu ispitivanih mlečnih krava.

Tabela 5.1.13. Koncentracija magnezijuma u krvnom serumu mlečnih krava (mmol/l)

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	0,84 ^{axy}	0,43	0,07	37,60	1,83	0,47
II	-2	21	0,99 ^{bc}	0,34	0,05	22,03	1,62	0,70
III	-1	21	1,13	0,44	0,08	32,00	1,86	0,57
IV	1	21	1,11	0,35	0,05	22,09	1,60	0,64
V	2	21	1,12 ^a	0,88	0,11	37,99	2,47	0,77
VI	3	21	1,46 ^{xb}	0,67	0,09	27,06	2,39	0,87
VII	6	21	1,44 ^{yc}	0,44	0,08	25,99	2,52	1,05

Ista mala slova a, b, c, označavaju signifikantnu razliku za $p < 0,05$, a x, y signifikantnu razliku za $p < 0,01$

Dobijeni rezultati su prikazani i grafički.



Grafikon 5.1.13a. Prosečne vrednosti koncentracije magnezijuma (mmol/l) i interkvartilne razlike (IQR) u krvnom serumu krava u peripartalnom periodu u sedam termina ispitivanja * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$

Najmanja prosečna koncentracija magnezijuma je registrovana u trećoj nedelji pre teljenja ($0,84 \pm 0,43$ mmol/l) i bila je signifikantno manja ($p < 0,01$) u odnosu na koncentracije u trećoj i šestoj nedelji nakon teljenja. Najveća prosečna koncentracija magnezijuma je utvrđena u trećoj nedelji posle teljenja. Značajne razlike ($p < 0,05$) su ustanovljene između vrednosti registrovanih u drugoj nedelji pre teljenja u odnosu na treću i šestu nedelju posle teljenja. Između ostalih termina nisu ustanovljene signifikantne razlike ($p > 0,05$). Koeficijent varijacije je bio najveći u drugoj nedelji posle teljenja (37,99%), a najmanji u drugoj nedelji pre teljenja (22,03%), Zbog ovakvih variranja u statističkoj analizi su primenjivani neparametrijski testovi.

5.2. Vrednosti hematoloških parametara mlečnih krava

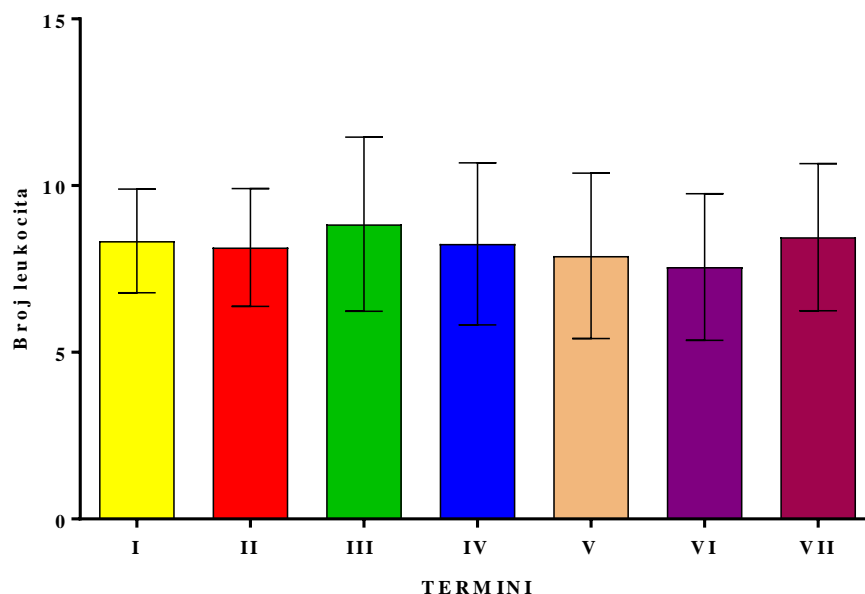
Kao i pri određivanju vrednosti biohemijskih parametara, krv je uzorkovana u tri termina pre teljenja i četiri termina posle toga (I – VII). Za deskriptivne statističke parametre korišćene su iste skraćenice kao u prethodnom podpoglavlju.

U tabeli 5.2.1. su prikazane vrednosti ukupnog broja leukocita u punoj krvi mlečnih krava uključenih u ispitivanja.

Tabela 5.2.1. Broj leukocita (Le) u krvi mlečnih krava ($10^9/l$)

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	8,34	1,56	0,34	18,67	10,71	5,99
II	-2	21	8,14	1,77	0,38	21,69	13,09	5,50
III	-1	21	8,84	2,61	0,57	29,54	14,63	2,83
IV	1	21	8,25	2,43	0,53	29,42	14,49	4,68
V	2	21	7,89	2,48	0,54	31,41	13,23	3,88
VI	3	21	7,56	2,20	0,48	29,11	11,26	3,98
VII	6	21	8,45	2,21	0,48	26,11	12,13	4,40

Radi bolje preglednosti, rezultati merenja su prikazani i grafički.



Grafikon 5.2.1a. Prosečne vrednosti broja leukocita ($\times 10^9$) i standardne devijacije ($Le \pm SD$) u krvi krava u peripartalnom periodu u sedam termina ispitivanja

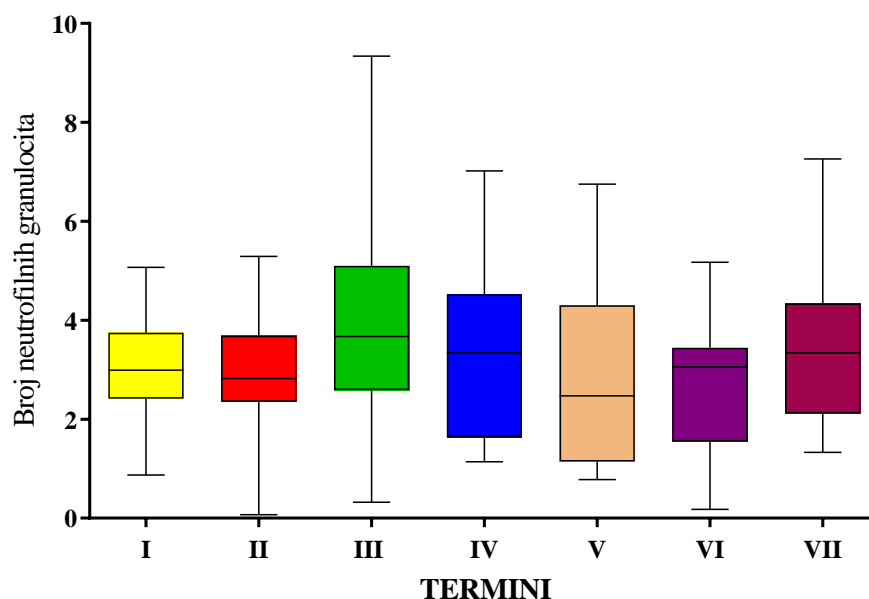
Analizom rezultata dobijenih određivanjem broja leukocita u krvi mlečnih krava ustanovljeno je da je najmanji prosečan broj ovih ćelija registrovan u trećoj nedelji nakon teljenja ($7,56 \pm 2,20 \times 10^9/l$), a najveći u prvoj nedelji pre teljenja ($8,84 \pm 2,61 \times 10^9/l$). Analizom statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti ovog parametra nisu ustanovljene signifikantne razlike u odnosu na termine ispitivanja ($p > 0,05$). Najveći koeficijent varijacije je zabeležen u drugoj nedelji nakon teljenja (31,41%), a najmanji u trećoj nedelji pre teljenja (18,76%).

Vrednosti dobijene određivanjem ukupnog broja neutrofilnih granulocita u punoj krvi mlečnih krava uključenih u ispitivanja prikazane su u tabeli 5.2.2.

Tabela 5.2.2. Broj neutrofilnih granulocita (Ne) u krvi mlečnih krava ($10^9/l$)

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	3,0	0,98	0,21	32,41	5,07	0,87
II	-2	21	2,9	1,1	0,24	36,77	5,29	0,07
III	-1	21	4,0	2,11	0,46	52,61	9,34	0,32
IV	1	21	3,2	1,74	0,38	53,00	7,02	1,14
V	2	21	2,9	1,83	0,40	62,79	6,75	0,78
VI	3	21	2,7	1,25	0,27	46,17	5,17	0,18
VII	6	21	3,5	1,46	0,32	42,07	7,26	1,33

Dobijeni rezultati su prikazani i grafički.



Grafikon 5.2.2a. Prosečne vrednosti broja neutrofilnih granulocita ($\times 10^9$) i standardne devijacije ($Ne \pm SD$) u krvi krava u peripartalnom periodu u sedam termina ispitivanja

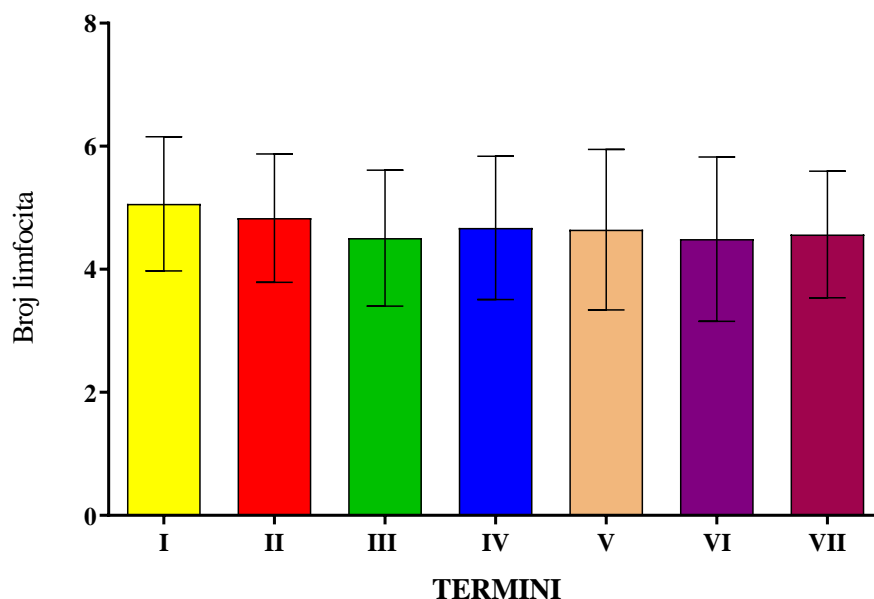
Najmanji prosečan broj neutrofilnih granulocita registrovan je u trećoj nedelji nakon teljenja ($2,7 \pm 1,25 \times 10^9/l$), a najveći u prvoj nedelji pre teljenja ($4,0 \pm 2,11 \times 10^9/l$). Zbog visokih vrednosti koeficijenata varijacije u statističkim analizama su korišćeni neparametrijski testovi. Nisu ustanovljene statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti za broj Ne u posmatranim intervalima. Najveći koeficijent varijacije je zabeležen u drugoj nedelji nakon teljenja (62,79%), a najmanji u trećoj nedelji pre teljenja (32,41%).

U tabeli 5.2.3. prikazane su vrednosti dobijene određivanjem broja limfocita u punoj krvi mlečnih krava uključenih u ispitivanja.

Tabela 5.2.3. Broj limfocita (Ly) u krvi mlečnih krava ($10^9/l$)

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	5,06	1,1	0,24	21,54	7,09	3,25
II	-2	21	4,83	1,04	0,23	21,58	7,69	3,30
III	-1	21	4,51	1,1	0,24	24,51	6,24	1,51
IV	1	21	4,67	1,16	0,25	24,91	6,23	2,53
V	2	21	4,64	1,3	0,28	28,09	6,36	1,52
VI	3	21	4,49	1,34	0,29	29,75	7,42	2,48
VII	6	21	4,57	1,03	0,22	22,56	6,72	2,63

Radi bolje preglednosti, rezultati merenja su prikazani i grafički.



Grafikon 5.2.3a. Prosečne vrednosti broja limfocita ($\times 10^9$) i standardne devijacije ($Ly \pm SD$) u krvi krava u peripartalnom periodu u sedam termina ispitivanja

Najmanji prosečan broj limfocita je registrovan u trećoj nedelji nakon teljenja ($4,49 \pm 1,34 \times 10^9/l$), a najveći u prvoj nedelji pre teljenja ($5,06 \pm 1,1 \times 10^9/l$). Statistička analiza značajnosti razlika između srednjih vrednosti ovog parametra nije ukazala na signifikantne razlike u odnosu na termine ispitivanja. Najveći koeficijent varijacije je zabeležen u trećoj nedelji nakon teljenja (29,75%), a najmanji u trećoj nedelji pre teljenja (21,54%).

U tabeli 5.2.4. su prikazani deskriptivni statistički parametri za vrednosti dobijene određivanjem procenta limfocita u punoj krvi mlečnih krava uključenih u ispitivanja.

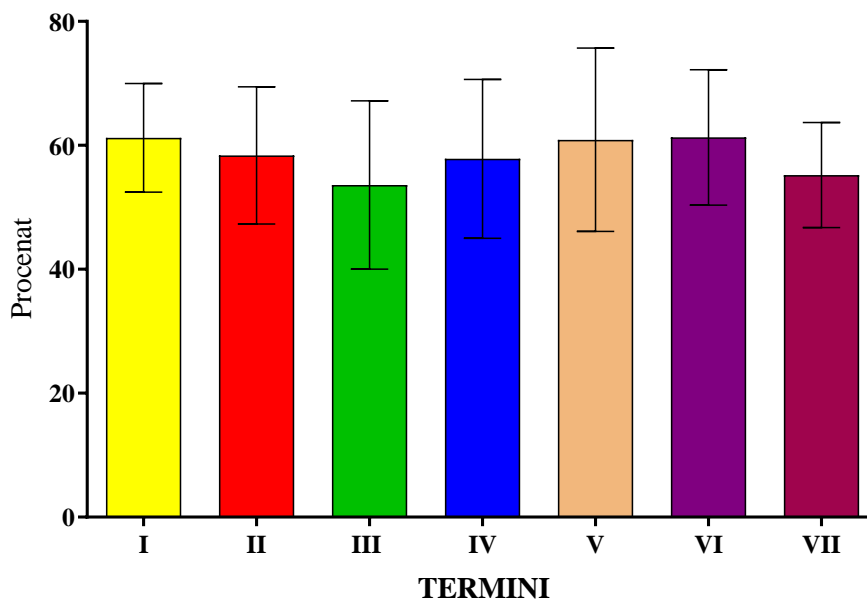
Tabela 5.2.4. Procenat limfocita (Ly %) u krvi mlečnih krava

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	61,22	8,77	1,91	14,32	84,60	46,40
II	-2	21	58,38	11,08	2,42	18,98	95,20	42,30
III	-1	21	53,61	13,58	2,96	25,34	88,60	28,50
IV	1	21	57,83	12,83	2,80	22,18	77,10	31,40
V	2	21	60,90	14,79	3,23	24,29	86,30	25,30
VI	3	21	61,28	10,92	2,38	17,81	86,50	40,50
VII	6	21	55,20	8,48	1,85	15,36	69,80	39,50

Najmanja srednja vrednost procenta limfocita utvrđena je u prvoj nedelji pre teljenja ($53,61 \pm 13,58$ %), a najveća u trećoj nedelji nakon teljenja ($61,28 \pm 10,92$ %). Analizom statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja limfocita nisu ustanovljene

signifikantne razlike u odnosu na termine ispitivanja ($p>0,05$). Najveći koeficijent varijacije je uočen u prvoj (25,34%), a najmanji u trećoj nedelji pre teljenja (14,32%).

Rezultati su radi bolje preglednosti prikazani i na grafikonu 5.2.4a.



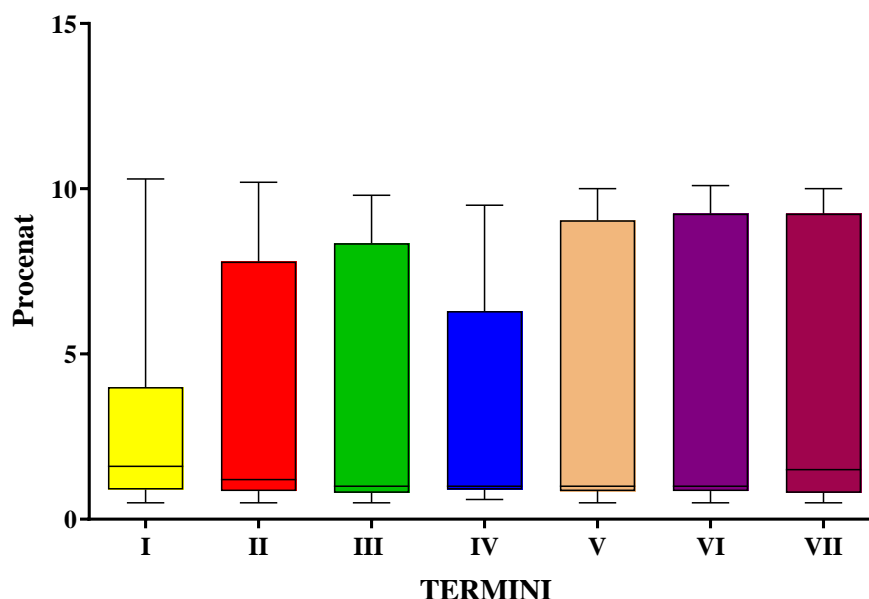
Grafikon 5.2.4a. Procenat učešća limfocita u beloj krvnoj lozi (%) i standardne devijacije ($Ly\% \pm SD$) u krvi krava u peripartalnom periodu u sedam termina ispitivanja

Vrednosti dobijene određivanjem procenta monocita u punoj krvi mlečnih krava uključenih u ispitivanja i odgovarajući deskriptivni statistički parametri prikazani su u tabeli 5.2.5.

Tabela 5.2.5. Procenat monocita (Mo %) u krvi mlečnih krava

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	1,60	3,10	0,72	107,94	10,30	0,50
II	-2	21	1,20	6,95	0,80	96,37	10,20	0,50
III	-1	21	1,00	7,55	0,84	108,69	9,80	0,50
IV	1	21	1,00	5,40	0,78	117,95	9,50	0,60
V	2	21	1,00	8,20	0,85	103,69	10,00	0,50
VI	3	21	1,00	8,40	0,94	95,90	10,10	0,50
VII	6	21	1,50	8,45	0,94	89,17	10,00	0,50

Radi bolje preglednosti, rezultati merenja su prikazani i grafički.



Grafikon 5.2.5a. Prosečne vrednosti za procenat učešća monocita u beloj krvnoj lozi i interkvartilne razlike (IQR) u krvi krava u peripartalnom periodu u sedam termina ispitivanja

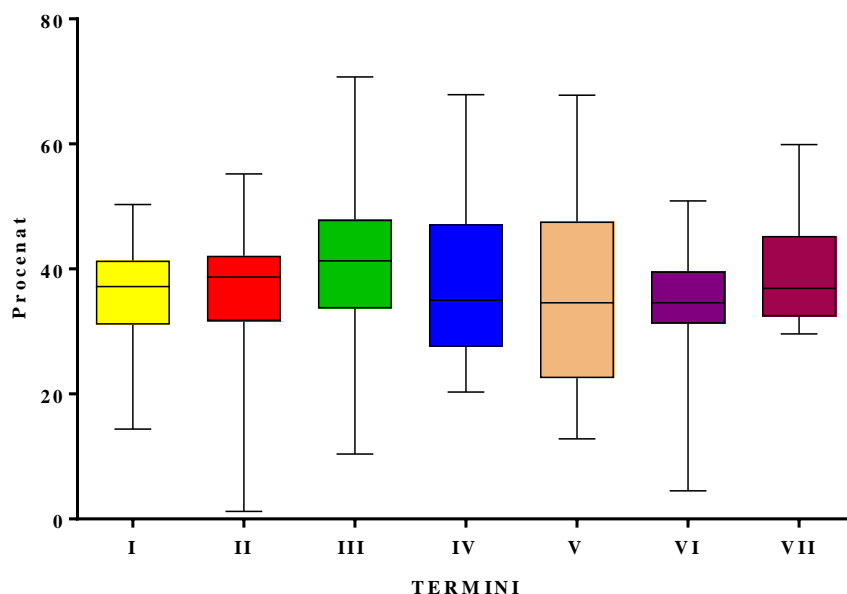
Najmanji prosečan procenat monocita je registrovan od prve nedelje pre, do treće nedelje nakon teljenja ($1,00 \pm 7,55$ do $1,00 \pm 8,40$ %), a najveći u trećoj nedelji pre teljenja ($1,60 \pm 3,10$ %). Vrednosti dobijene određivanjem procenta monocita nisu bile normalno distribuirane i koeficijenti varijacija su bili vrlo visoki tako da nisu dokazane signifikantne razlike u posmatranim terminima. Najveći koeficijent varijacije je uočen u prvoj nedelji nakon teljenja (117,95 %), a najmanji u šestoj (89,17 %).

Vrednosti dobijene određivanjem procenta neutrofilnih granulocita u punoj krvi mlečnih krava uključenih u ispitivanja i odgovarajući deskriptivni statistički parametri prikazani su u tabeli 5.2.6.

Tabela 5.2.6. Procenat neutrofilnih granulocita (Ne %) u punoj krvi mlečnih krava

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	37,20	10,25	1,93	24,74	50,30	14,40
II	-2	21	38,70	10,45	2,42	30,78	55,20	1,20
III	-1	21	41,30	14,20	2,86	30,60	70,70	10,40
IV	1	21	35,00	19,60	2,77	33,71	67,90	20,30
V	2	21	34,60	25,05	3,33	43,64	67,80	12,80
VI	3	21	34,60	8,35	2,30	30,75	50,90	4,50
VII	6	21	36,90	12,90	1,90	21,76	59,90	29,60

Rezultati su radi bolje preglednosti prikazani i grafički.



Grafikon 5.2.6a. Prosečne vrednosti za procenat učešća neutrofilnih granulocita u beloj krvnoj lozi i interkvartilne razlike (IQR) u krvi krava u peripartalnom periodu u sedam termina ispitivanja

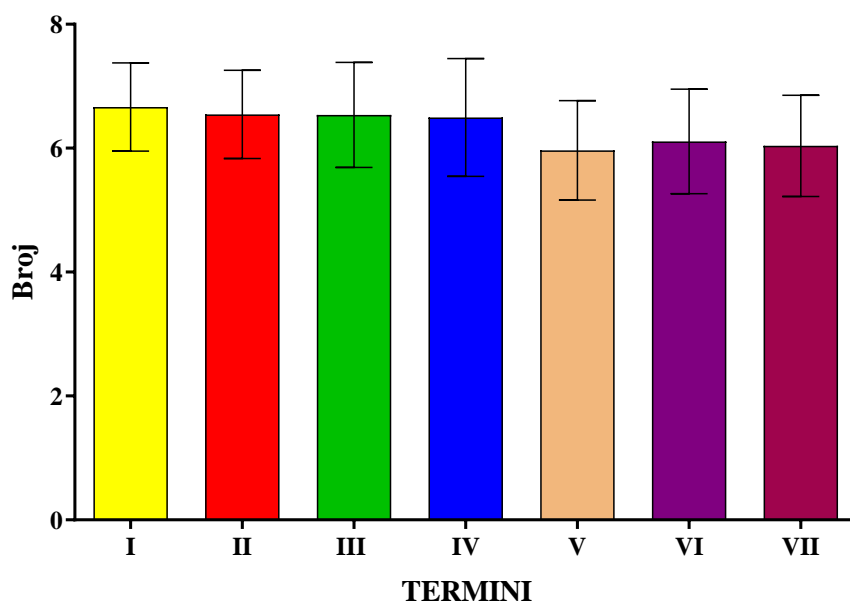
Najmanja srednja vrednost procenta neutrofilnih granulocita zabeležena je u drugoj i trećoj nedelji nakon teljenja ($34,60 \pm 25,05$ % i $34,60 \pm 8,35$ %), a najveća u prvoj nedelji pre teljenja ($41,30 \pm 14,20$ %). Statističkom analizom razlika u srednjim vrednostima ovog parametra nisu ustanovljene signifikantne razlike u odnosu na termine ispitivanja ($p > 0,05$). Vrednosti procenta neutrofilnih granulocita takođe nisu bile normalno distribuirane i u analizi statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti su korišćeni neparametrijski testovi. Najveći koeficijent varijacije je utvrđen u drugoj nedelji (43,64%), a najmanji je u šestoj nedelji nakon teljenja (21,76%).

Deskriptivni statistički parametri, izračunati nakon određivanja broja eritrocita u punoj krvi mlečnih krava uključenih u ispitivanja prikazani su u tabeli 5.2.7.

Tabela 5.2.7. Broj eritrocita (Er) u punoj krvi goveda ($10^{12}/l$)

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	6,67	0,71	0,15	10,68	8,11	5,54
II	-2	21	6,54	0,71	0,15	10,87	8,42	5,72
III	-1	21	6,54	0,85	0,18	12,99	8,10	4,72
IV	1	21	6,50	0,95	0,21	14,63	8,39	5,28
V	2	21	5,97	0,80	0,17	13,44	7,55	4,49
VI	3	21	6,11	0,84	0,18	13,79	7,69	5,01
VII	6	21	6,04	0,82	0,18	13,52	7,70	4,97

Radi bolje preglednosti, rezultati merenja su prikazani i grafički.



Grafikon 5.2.7a. Prosečne vrednosti broja eritrocita ($\times 10^{12}$) i standardne devijacije ($Er \pm SD$) u krvi krava u peripartalnom periodu u sedam termina ispitivanja

Najmanji prosečan broj eritrocita je zabeležen u drugoj nedelji nakon teljenja ($5,97 \pm 0,80 \times 10^{12}/l$), a najveći u trećoj nedelji pre teljenja ($6,67 \pm 0,71 \times 10^{12}/l$). Statističkom analizom razlika između srednjih vrednosti ovog parametra nisu ustanovljene signifikantne razlike u odnosu na termine ispitivanja ($p > 0,05$). Najveći koeficijent varijacije je zapažen u prvoj nedelji nakon teljenja (14,63%), a najmanji u trećoj nedelji pre teljenja (10,68%).

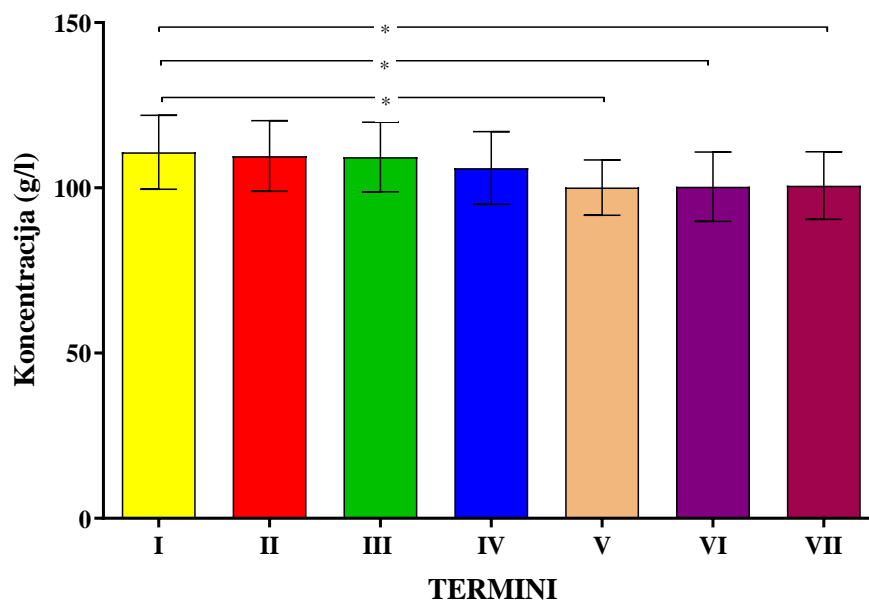
Rezultati dobijeni određivanjem koncentracije hemoglobina u punoj krvi mlečnih krava uključenih u ispitivanja i odgovarajući deskriptivni statistički parametri prikazani su u tabeli 5.2.8.

Tabela 5.2.8. Koncentracija hemoglobina (Hb) u punoj krvi mlečnih krava (g/l)

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	110,80 ^{abc}	11,17	2,44	10,09	136,00	92,00
II	-2	21	109,60	10,68	2,33	9,75	138,00	94,00
III	-1	21	109,30	10,54	2,30	9,64	135,00	84,00
IV	1	21	106,00	11,01	2,40	10,39	133,00	92,00
V	2	21	100,10 ^a	8,38	1,83	8,37	116,00	86,00
VI	3	21	100,40 ^b	10,49	2,29	10,45	121,00	84,00
VII	6	21	100,70 ^c	10,22	2,23	10,16	125,00	88,00

Ista mala slova a, b, c ukazuju na signifikantnu razliku, $p < 0,05$

Radi bolje preglednosti, rezultati su prikazani i grafikonom.



Grafikon 5.2.8a. Prosečne vrednosti koncentracije hemoglobina (g/l) i standardne devijacije (Hb ± SD) u krvi krava u peripartalnom periodu u sedam termina ispitivanja (* p<0,05)

Najveća prosečna koncentracija hemoglobina u krvi krava uključenih u ispitivanja je izmerena u trećoj nedelji pre teljenja ($110,80 \pm 11,17$ g/l) i ona je bila signifikantno veća ($p \leq 0,05$) u odnosu na koncentracije u drugoj, trećoj i šestoj nedelji nakon teljenja. Najmanja prosečna koncentracija hemoglobina u krvi krava je izmerena u drugoj nedelji posle teljenja ($100,10 \pm 8,38$ g/l). Između ostalih termina nisu ustanovljene signifikantne razlike ($p > 0,05$). Variranje vrednosti ovog parametra je bilo malo. Najveći koeficijent varijacije je registrovan u trećoj (10,45%), a najmanji u drugoj nedelji nakon teljenja (8,37%).

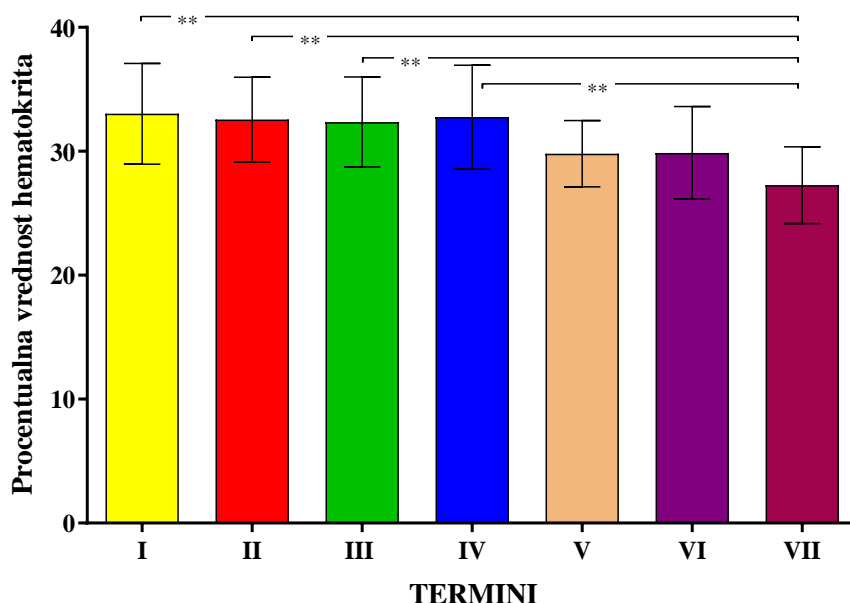
Deskriptivni statistički parametri izračunati nakon određivanja hematokritske vrednosti u punoj krvi mlečnih krava uključenih u ispitivanja prikazani su u tabeli 5.2.9.

Tabela 5.2.9. Hematokritska vrednost (Hct) kod mlečnih krava (%)

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	33,03 ^x	4,07	0,89	12,31	43,76	27,31
II	-2	21	32,56 ^y	3,43	0,75	10,52	39,38	28,64
III	-1	21	32,37 ^z	3,63	0,79	11,20	39,12	24,06
IV	1	21	32,76 ^w	4,19	0,91	12,77	45,39	28,19
V	2	21	29,81	2,67	0,58	8,95	35,27	24,87
VI	3	21	29,87	3,73	0,81	12,50	37,55	25,05
VII	6	21	27,27 ^{xyzw}	3,10	0,67	11,35	36,50	23,99

Ista mala slova x, y, z, w, predstavljaju vrlo signifikantnu razliku ($p < 0,01$)

Grafički prikaz rezultata predstavljenih u tabeli, jasno ukazuje na razlike između pojedinih termina.



Grafikon 5.2.9a. Srednja procentualna vrednost hematokrita (Hct % ± SD) u krvi krava u peripartalnom periodu u sedam termina ispitivanja (**p<0,01)

Najniža hematokritska vrednost je izmerena u šestoj nedelji nakon teljenja (27,27±3,10 %), i bila je signifikantno manja (p<0,01) u odnosu na prosečne vrednosti u terminima pre teljenja, kao i u odnosu na prvu nedelju nakon teljenja. Između ostalih termina nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike (p>0,05). Najviša hematokritska vrednost je izmerena u trećoj nedelji pre teljenja (33,03±4,07 %). Variranje vrednosti ovog parametra je bilo malo. Najveći koeficijent varijacije je registrovan u prvoj nedelji (12,77 %), a najmanji u drugoj nedelji nakon teljenja (8,95 %).

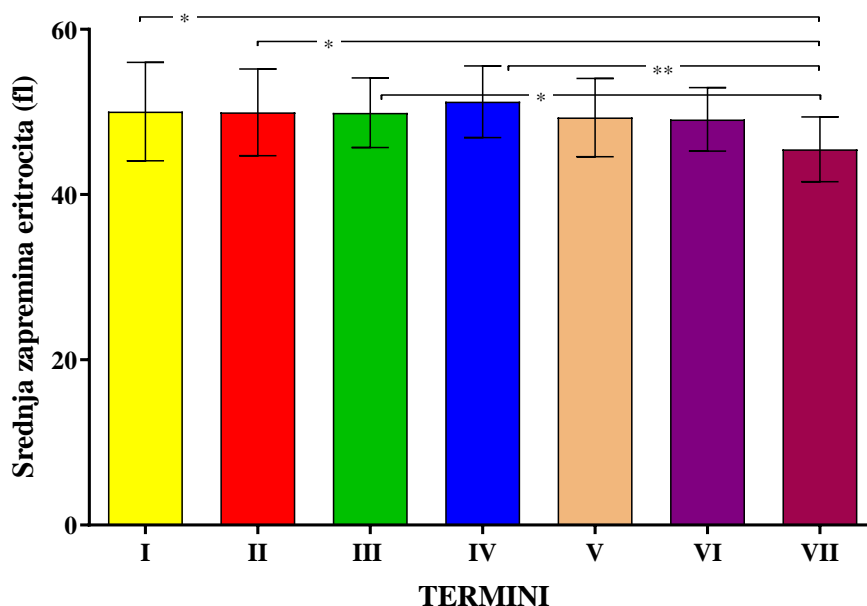
Rezultati dobijeni izračunavanjem srednje zapremine eritrocita (MCV) mlečnih krava uključenih u ispitivanja i odgovarajući deskriptivni statistički parametri prikazani su u tabeli 5.2.10.

Tabela 5.2.10. Srednja zapremina eritrocita MCV (fL) kod mlečnih krava

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	50,05 ^a	5,96	1,30	11,91	63,00	41,00
II	-2	21	49,95 ^b	5,25	1,14	10,51	59,00	41,00
III	-1	21	49,90 ^c	4,22	0,92	8,45	57,00	42,00
IV	1	21	51,24 ^x	4,35	0,95	8,48	59,00	43,00
V	2	21	49,33	4,74	1,03	9,60	60,00	42,00
VI	3	21	49,10	3,85	0,84	7,83	55,00	40,00
VII	6	21	45,48 ^{abex}	3,91	0,85	8,59	55,00	39,00

Ista mala slova a, b, c, ukazuju na signifikantnu razliku, p<0,05, dok x ukazuje na vrlo signifikantnu razliku p<0,01

Rezultati su radi bolje preglednosti prikazani i grafikonom.



Grafikon 5.2.10a. Srednja zapremina eritrocita (fl^2) i standardne devijacije ($\text{MCV} \pm \text{SD}$) u krvi krava u peripartalnom periodu u sedam termina ispitivanja (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

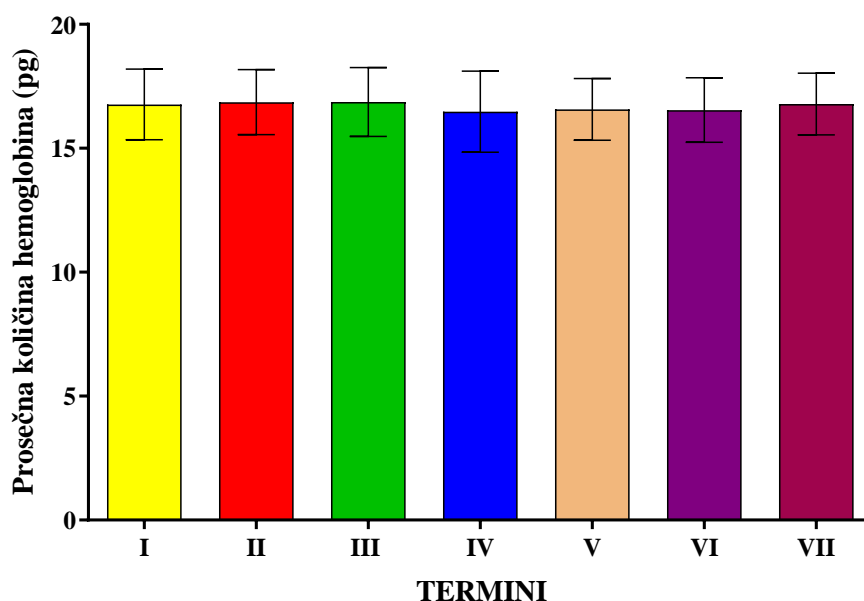
Najmanja srednja vrednost zapremine eritrocita mlečnih krava registrovana je u šestoj nedelji nakon teljenja ($45,48 \pm 3,91 \text{ fL}$) i bila je signifikantno manja ($p > 0,05$) u odnosu na prosečne vrednosti u terminima pre teljenja, kao i vrlo značajno manja ($p < 0,01$) u odnosu na vrednost u prvoj nedelji nakon teljenja. Između ostalih termina posmatranja nije ustanovljena signifikantna razlika ($p > 0,05$). Variranje vrednosti ovog parametra je bilo malo, pa je najveći koeficijent varijacije zabeležen u trećoj nedelji pre teljenja (11,91%), a najmanji u trećoj nedelji nakon teljenja (7,83%).

Deskriptivni statistički parametri izračunati nakon određivanja količine hemoglobina u punoj krvi mlečnih krava uključenih u ispitivanja prikazani su u tabeli 5.2.11.

Tabela 5.2.11. Prosečna količina hemoglobina u eritrocitima (MCH) kod mlečnih krava (pg)

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	16,77	1,424	0,31	8,49	20,10	14,40
II	-2	21	16,86	1,311	0,29	7,77	19,50	15,00
III	-1	21	16,87	1,392	0,30	8,25	19,70	14,00
IV	1	21	16,48	1,639	0,36	9,95	19,30	12,90
V	2	21	16,57	1,247	0,27	7,53	19,20	14,30
VI	3	21	16,54	1,297	0,28	7,84	19,20	14,50
VII	6	21	16,79	1,248	0,27	7,43	19,00	14,40

Rezultati su radi bolje preglednosti prikazani i grafikonom.



Grafikon 5.2.11a. Prosečna količina hemoglobina u eritrocitima (MCH ± SD pg) u krvi krava u peripartalnom periodu u sedam termina ispitivanja

Najmanja srednja vrednost količine hemoglobina u eritrocitima je registrovana u prvoj nedelji nakon teljenja ($16,48 \pm 1,64$ pg), a najveća u prvoj nedelji pre teljenja ($16,87 \pm 1,39$ pg). Nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike u srednjim vrednostima ovog parametra u odnosu na termine ispitivanja ($p > 0,05$). Variranje srednjih vrednosti je bilo malo, tako da je najveći koeficijent varijacije zapažen u prvoj (9,95 %), a najmanji je u šestoj nedelji nakon teljenja (7,43 %).

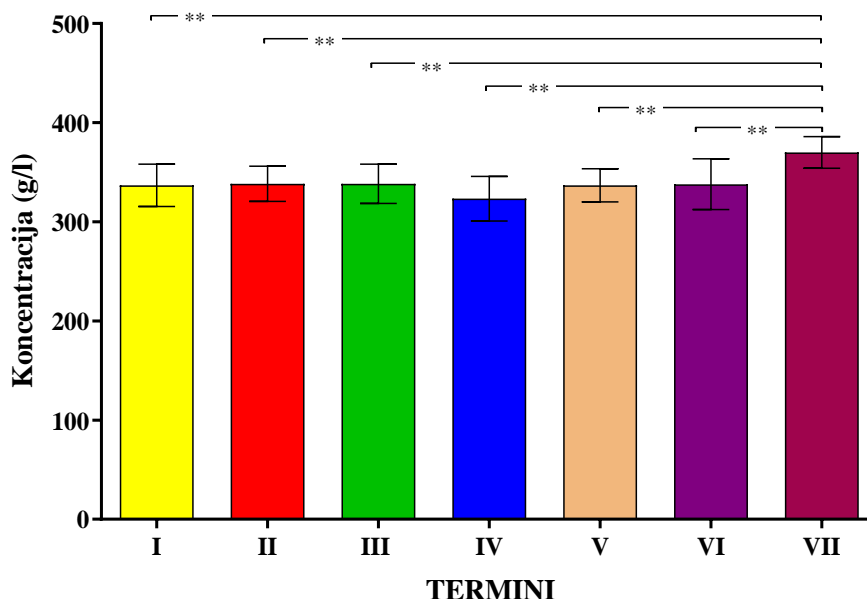
Rezultati dobijeni izračunavanjem srednje vrednosti procenta hemoglobina (MHCV) u eritrocitima mlečnih krava uključenih u ispitivanja i odgovarajući deskriptivni statistički parametri prikazani su u tabeli 5.2.12.

Tabela 5.2.12. Prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitima (MCHC)

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	33,68 ^x	2,13	0,46	6,33	37,10	28,70
II	-2	21	33,83 ^y	1,77	0,39	5,23	36,60	29,10
III	-1	21	33,83 ^z	1,98	0,43	5,87	37,10	29,90
IV	1	21	32,34 ^w	2,25	0,49	6,96	34,80	23,80
V	2	21	33,68 ^q	1,66	0,36	4,95	35,30	29,70
VI	3	21	33,79 ^r	2,56	0,56	7,58	37,60	27,70
VII	6	21	37,00 ^{xyzwqr}	1,58	0,35	4,29	40,10	34,20

Ista mala slova x, y, z, w, q, r, ukazuju na vrlo signifikantnu razliku, $p < 0,01$

Rezultati su radi bolje preglednosti prikazani i grafikonom.



Grafikon 5.2.12a. Prosečna koncentracija hemoglobina po eritrocitu (MCHC \pm SD g/l) u krvi krava u peripartalnom periodu u sedam termina ispitivanja (* $p > 0,05$; ** $p < 0,01$)

Najveća srednja vrednost za MCHC ustanovljena je u šestoj nedelji nakon teljenja ($37,00 \pm 1,58$ %) i bila je signifikantno veća ($p < 0,01$) u odnosu na prosečne koncentracije u svim ostalim terminima. Između ostalih termina nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$). Variranje vrednosti je bilo izuzetno malo. Najveći koeficijent varijacije je zapažen u trećoj nedelji (7,58 %), a najmanji u šestoj nedelji nakon teljenja (4,29 %).

5.3. Funkcionalna aktivnost neutrofilnih granulocita u krvi mlečnih krava

5.3.1. Rezultati testa fagocitne sposobnosti neutrofilnih granulocita (Phagotest®)

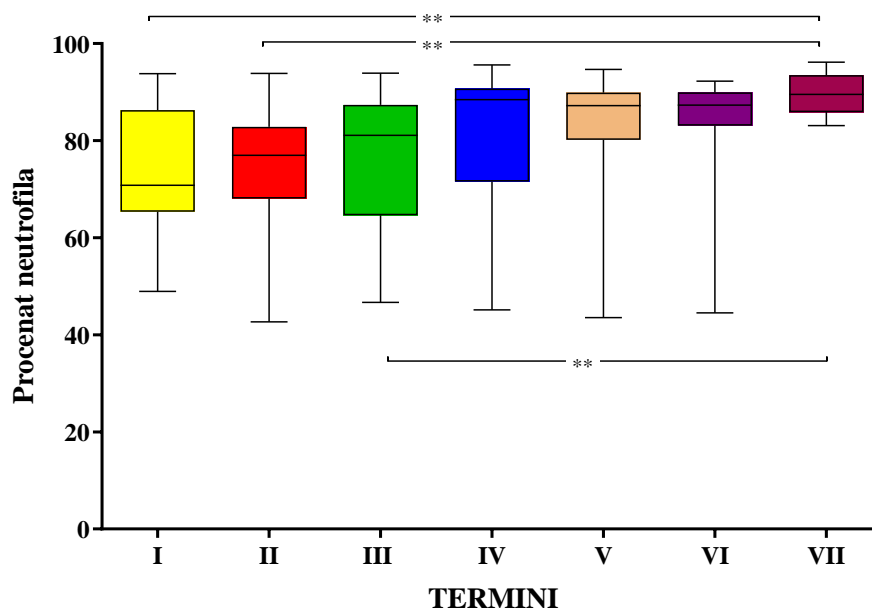
U tabeli 5.3.1.1. su prikazani rezultati dobijeni određivanjem procenta neutrofilnih granulocita koji su izvršili fagocitozu kao i odgovarajući deskriptivni statistički parametri.

Tabela 5.3.1.1. Procenat neutrofilnih granulocita koji su izvršili fagocitozu (Ne%F)

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	70,80 ^x	20,93	2,87	17,89	93,81	48,92
II	-2	21	77,00 ^y	14,75	2,46	15,02	93,87	42,69
III	-1	21	81,08 ^z	22,72	3,04	18,36	93,88	46,70
IV	1	21	88,44	19,11	3,06	17,53	95,62	45,16
V	2	21	87,22	9,70	2,81	15,59	94,68	43,56
VI	3	21	87,34	6,83	2,27	12,30	92,25	44,53
VII	6	21	89,54 ^{xyz}	7,61	0,88	4,48	96,18	83,08

Ista mala slova x, y, z ukazuju na vrlo signifikantnu razliku ($p < 0,01$)

Rezultati su radi bolje preglednosti prikazani i na grafikonu 5.3.1.1a.



Grafikon 5.3.1.1a. Procentat neutrofilnih granulocita koji su izvršili fagocitozu (Ne%F), interkvartilne razlike (IQR) u krvi krava u sedam različitih termina u peripartalnom periodu $p < 0,01$ (**)

Najmanja srednja vrednost procenta neutrofilnih granulocita koji su reagovali fagocitozom je zabeležena u trećoj nedelji pre teljenja ($70,80 \pm 20,93$ %), a najveća u šestoj nedelji nakon teljenja ($89,54 \pm 7,61$ %) i bila je signifikantno veća ($p < 0,01$) u odnosu na prosečne procentualne vrednosti u terminima pre teljenja. Između ostalih termina nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$). Vrednosti za ovaj parametar su izražene u procentima tako da su pri statističkoj analizi primenjivani neparametrijski testovi. Najveći koeficijent varijacije je dokazan u prvoj nedelji pre teljenja (18,36%), a najmanji u šestoj nedelji nakon teljenja (4,48%).

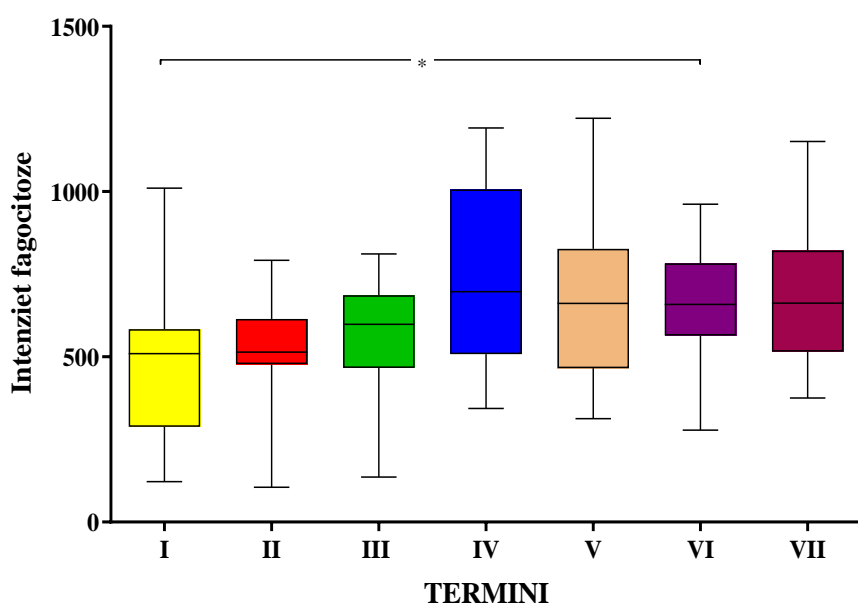
Rezultati dobijeni određivanjem prosečnog intenziteta fluorescencije neutrofilnih granulocita tokom fagocitoze kao i odgovarajući deskriptivni statistički parametri prikazani su u tabeli 5.3.1.2.

Tabela 5.3.1.2. Prosečan intenzitet fluorescencije neutrofilnih granulocita tokom fagocitoze (MIF F)

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	510,00 ^a	295,60	51,94	50,46	1010,00	122,20
II	-2	21	514,00	136,50	35,37	31,47	792,40	105,70
III	-1	21	598,30	219,90	35,64	28,85	811,60	136,50
IV	1	21	697,30	499,00	54,28	34,09	1193,00	343,40
V	2	21	661,70	360,80	56,18	38,54	1222,00	312,70
VI	3	21	658,90 ^a	218,50	40,99	28,48	962,00	278,40
VII	6	21	662,60	305,90	40,62	27,75	1151,00	375,60

Ista mala slova a ukazuju na signifikantnu razliku ($p < 0,05$)

Dobijeni rezultati su prikazani i na grafikonu 5.3.1.2a.



Grafikon 5.3.1.2a. Prosečne vrednosti intenziteta fluorescencije neutrofilnih granulocita tokom fagocitoze (MIF F), interkvartilne razlike (IQR) i signifikantne razlike $p < 0,05$ (*) u krvi krava u sedam različitih termina u peripartalnom periodu

Najmanji prosečan intenzitet fagocitoze je zabeležen u trećoj nedelji pre (510,00±295,60), a najveći u prvoj nedelji nakon teljenja (697,30±499,00). Kako intenzitet fluorescencije nije bio normalno distribuiran primenjeni su neparametrijski testovi. Prosečan intenzitet fagocitoze u trećoj nedelji nakon teljenja je bio signifikantno veći ($p < 0,05$) u odnosu na vrednost ovog parametra u trećoj nedelji pre teljenja. Između ostalih termina nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$). Najveći koeficijent varijacije je uočen u trećoj nedelji pre (50,46%), a najmanji u šestoj nedelji nakon teljenja (27,75%).

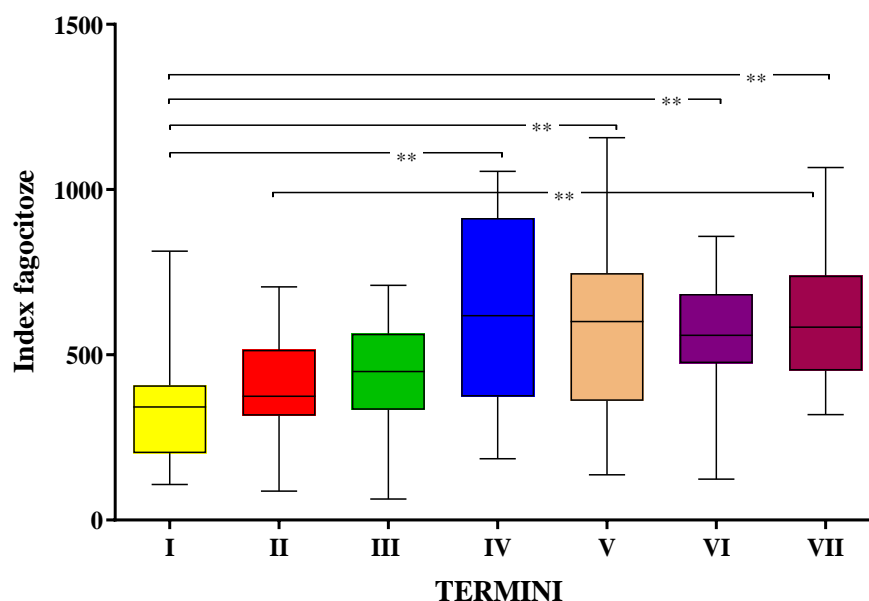
U tabeli 5.3.1.3. su izneti rezultati dobijeni izračunavanjem prosečnog indeksa fagocitoze neutrofilnih granulocita kao i odgovarajući deskriptivni statistički parametri.

Tabela 5.3.1.3. Indeks fagocitoze neutrofilnih granulocita (indeks F)

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	342,00 ^{xyza}	205,50	38,64	52,89	813,80	107,70
II	-2	21	375,00 ^w	199,20	32,16	38,01	705,40	87,44
III	-1	21	449,20	229,20	34,65	36,18	710,40	63,72
IV	1	21	618,30 ^x	540,70	59,77	45,16	1055,00	185,30
V	2	21	600,30 ^y	386,70	58,26	46,54	1157,00	137,20
VI	3	21	559,20 ^z	208,90	39,23	31,85	858,80	124,00
VII	6	21	583,40 ^{qw}	286,80	39,36	29,81	1067,00	319,20

Ista mala slova x, y, z, q, w ukazuju na vrlo signifikantnu razliku ($p < 0,01$)

Radi bolje preglednosti, rezultati merenja su prikazani i grafički.



Grafikon 5.3.1.3a. Prosečne vrednosti indeksa fagocitoze neutrofilnih granulocita (indeks F) i interkvartilne razlike (IQR) u krvi krava u sedam različitih termina u peripartalnom periodu $p < 0,01$ (**)

U analizi indeksa fagocitoze neutrofilnih granulocita (indeks F) primenjeni su neparametrijski testovi zbog izostanka normalne distribucije vrednosti. Najmanja prosečna vrednost indeksa fagocitoze je uočena u trećoj nedelji pre teljenja ($342,00 \pm 205,50$), a najveća u prvoj nedelji nakon teljenja ($618,30 \pm 540,70$). Statističkom analizom ovog parametra su ustanovljene sledeće signifikantne razlike: prosečna vrednost indeksa u trećoj nedelji pre teljenja je bila signifikantno manja ($p < 0,01$) u odnosu na prosečnu vrednost indeksa u terminima posle teljenja; statistički signifikantna razlika se uočava i između prosečnih vrednosti u drugoj nedelji pre i šestoj nedelji posle teljenja. Između ostalih termina nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$). Najveći koeficijent varijacije je registrovan u trećoj nedelji pre ($52,89\%$), a najmanji u šestoj nedelji nakon teljenja ($29,81\%$).

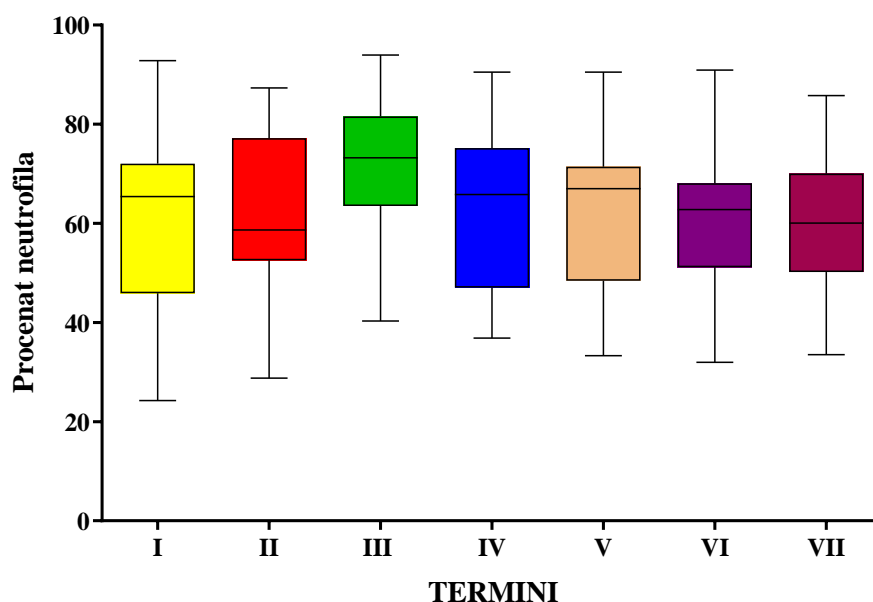
5.3.2. Rezultati testa sposobnosti neutrofilnih granulocita da izvrše respiratorni prasak (Phagoburst®)

U tabeli 5.3.2.1. su date vrednosti procenta neutrofilnih granulocita koji su ispoljili respiratorni prasak kao i odgovarajući parametri deskriptivne statistike.

Tabela 5.3.2.1. Procenat neutrofilnih granulocita koji su ispoljili aktivnost u smislu respiratornog praska (Ne%B)

	Nedelje do/od teljenja	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	65,39	26,10	3,67	27,61	92,80	24,27
II	-2	21	58,65	24,62	3,55	25,92	87,31	28,80
III	-1	21	73,21	18,03	3,04	19,54	93,95	40,30
IV	1	21	65,84	28,11	3,45	25,31	90,53	36,84
V	2	21	67,02	22,99	3,34	24,32	90,53	33,33
VI	3	21	62,79	16,95	3,15	23,63	90,91	31,97
VII	6	21	60,04	19,83	2,85	22,17	85,80	33,52

Dobijeni rezultati su prikazani i grafički.



Grafikon 5.3.2.1a.: Prosečne vrednosti udela neutrofilnih granulocita, koji su ispoljili aktivnost respiratornog praska i njihove interkvartilne razlike (IQR) u krvi krava u sedam različitih termina peripartalnog perioda

Najmanja srednja vrednost udela neutrofilnih granulocita, koji su ispoljili aktivnost respiratornog praska je zabeležena u drugoj nedelji pre (58,65±24,62%), a najveća u prvoj nedelji pre teljenja (73,21±18,03%). Statističkom analizom razlika u srednjim vrednostima ovog parametra nisu ustanovljene signifikantne razlike između pojedinih termina ispitivanja ($p > 0,05$). Vrednosti za ovaj parametar se izražavaju u procentima tako da su za ocenu statističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima primenjivani neparametrijski testovi. Najveći koeficijent varijacije je uočen u trećoj nedelji pre (27,61%), a najmanji u prvoj nedelji pre teljenja (19,54%).

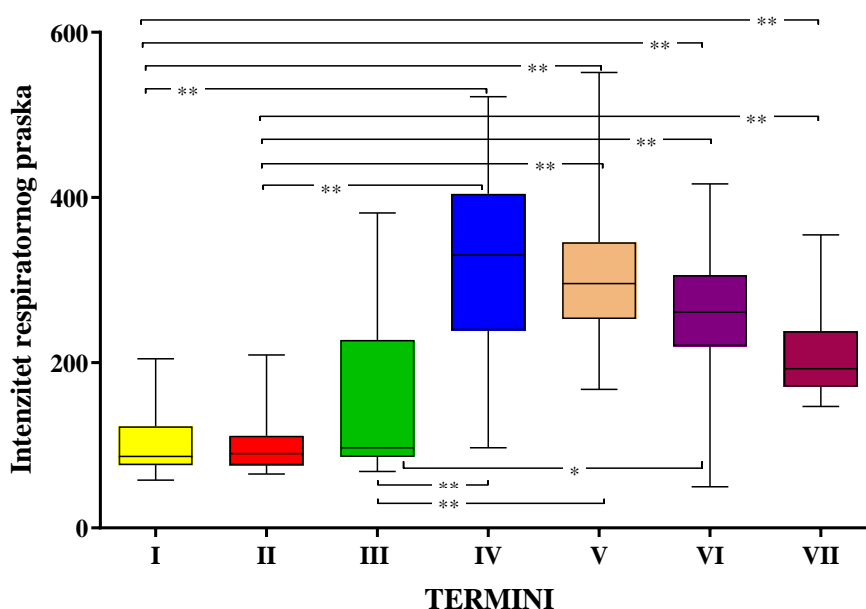
Vrednosti dobijene merenjem prosečnog intenziteta respiratornog praska neutrofilnih granulocita i odgovarajući parametri deskriptivne statistike prikazani su u tabeli 5.3.2.2.

Tabela 5.3.2.2. Prosečan intenzitet respiratornog praska neutrofilnih granulocita (MIF B)

	Nedelje do/od teljenja	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	86,62 ^{xyzq}	46,97	7,53	35,02	204,70	57,89
II	-2	21	89,99 ^{wrto}	35,44	7,02	32,64	209,40	65,20
III	-1	21	97,10 ^{pda}	141,69	20,61	61,20	381,40	68,48
IV	1	21	330,50 ^{xwp}	165,00	23,86	34,35	522,10	96,96
V	2	21	295,80 ^{yrd}	92,90	17,77	26,83	551,30	167,70
VI	3	21	261,30 ^{zta}	85,80	17,29	30,46	416,50	49,78
VII	6	21	192,70 ^{qo}	67,10	10,51	23,13	354,90	147,10

Ista mala slova x, y, z, q, w, r, t, o, p, d ukazuju na vrlo signifikantnu razliku ($p < 0,01$); malo slovo a označava signifikantnu razliku ($p < 0,05$)

Grafički prikaz rezultata predstavljenih u tabeli, jasno ukazuje na razlike između pojedinih termina.



Grafikon 5.3.2.2a Prosečne vrednosti MIF B neutrofilnih granulocita, interkvartilne razlike (IQR) u krvi krava u sedam različitih termina u peripartalnom periodu $p < 0,05$ (*) i $p < 0,01$ (**)

Prosečan intenzitet respiratornog praska u trećoj i drugoj nedelji pre teljenja ($86,62 \pm 46,97$ i $89,99 \pm 35,44$) je bio signifikantno manji ($p < 0,01$) u odnosu na vrednosti istog parametra u nedeljama nakon teljenja. Takođe je ustanovljena je i statistički vrlo signifikantna razlika ($p < 0,01$) između prosečnog intenziteta u prvoj nedelji pre teljenja u odnosu na vrednosti u prvoj i drugoj nedelji nakon teljenja, kao i statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na prosečan intenzitet u trećoj nedelji nakon teljenja. Između srednjih vrednosti registrovanih u ostalim terminima nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$).

Kako vrednosti za ovaj parametar nisu bile normalno distribuirane, za statističke analize su primenjivani neparametrijski testovi. Najveći koeficijent varijacije je registrovan u prvoj nedelji pre (61,20 %), a najmanji u šestoj nedelji nakon teljenja (23,13%).

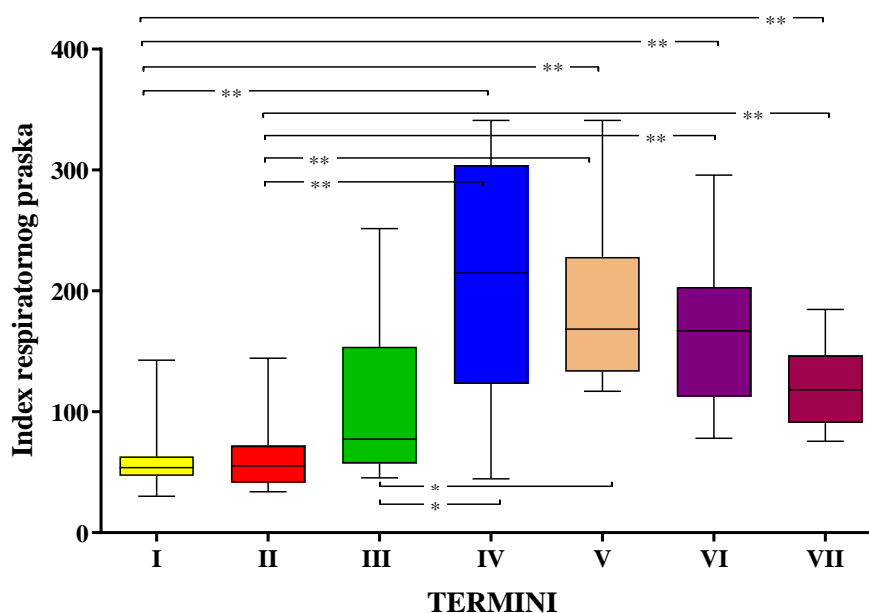
U tabeli 5.3.2.3. su prikazane vrednosti dobijene izračunavanjem intenziteta respiratornog praska neutrofilnih granulocita kao i odgovarajući parametri deskriptivne statistike.

Tabela 5.3.2.3. Indeks respiratornog praska neutrofilnih granulocita (indeks B)

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	21	53,72 ^{xyzq}	16,12	4,88	38,91	142,60	30,06
II	-2	21	55,20 ^{wrto}	30,58	6,03	44,71	144,30	33,81
III	-1	21	77,41 ^{ab}	96,45	14,07	60,06	251,60	45,28
IV	1	21	214,80 ^{xwa}	181,00	21,33	47,25	341,00	44,49
V	2	21	168,30 ^{yrb}	94,80	14,32	34,75	341,00	116,90
VI	3	21	167,00 ^{zt}	90,60	11,83	33,44	295,90	78,05
VII	6	21	118,20 ^{qo}	55,70	7,29	27,56	184,70	75,66

Ista mala slova x, y, z, q, w, r, t, o ukazuju na vrlo signifikantnu razliku ($p < 0,01$); ista mala slova a, b, predstavljaju signifikantnu razliku ($p < 0,05$)

Radi bolje preglednosti, rezultati merenja indeksa respiratornog praska neutrofilnih granulocita su prikazani i grafički.



Grafikon 5.3.2.3a. Prosečne vrednosti indeksa B neutrofilnih granulocita, interkvartilne razlike (IQR) i signifikantne razlike u krvi krava u sedam različitih termina posmatranja u peripartalnom period; $p < 0,05$ (*) i $p < 0,01$ (**)

Analizom vrednosti izračunatih za indeks respiratornog praska neutrofilnih granulocita, ustanovljena su izuzetno velika variranja i zbog toga su primenjivani neparametrijski testovi. Statističkom analizom vrednosti ovog parametra su ustanovljene vrlo signifikantne razlike ($p < 0,01$) u prosečnim vrednostima indeksa fagocitoze u trećoj i drugoj nedelji pre teljenja koje su bile manje u odnosu na prosečne vrednosti indeksa u terminima nakon teljenja. Takođe je ustanovljena je i signifikantna razlika ($p < 0,05$) između prosečne vrednosti indeksa fagocitoze u prvoj nedelji pre, u odnosu na vrednosti u prvoj i drugoj nedelji nakon teljenja. Najveći koeficijent varijacije je zabeležen u prvoj nedelji pre teljenja (60,06 %), a najmanji u šestoj nedelji nakon teljenja (27,56 %).

5.3.3. Rezultati za aktivnost mijeloperoksidaze u neutrofilnim granulocitima mlečnih krava

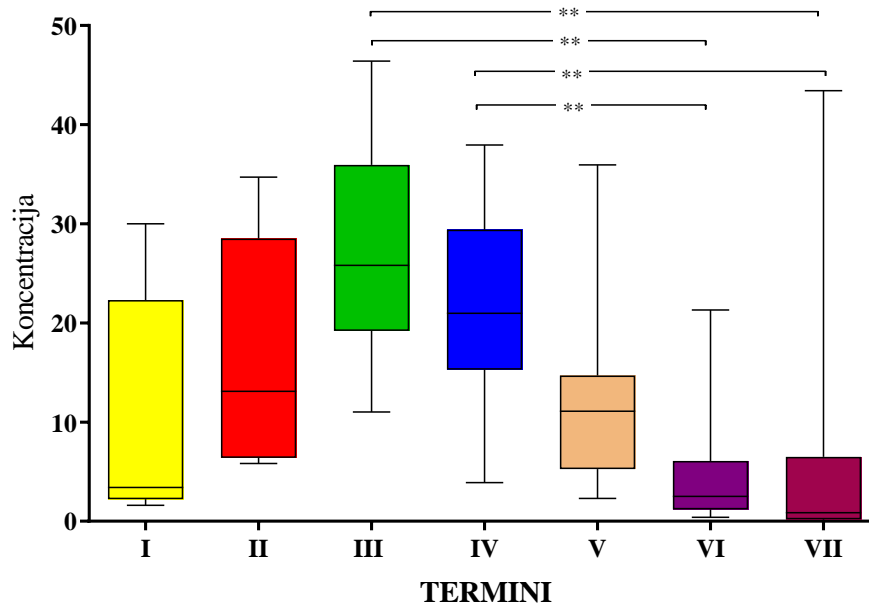
U tabeli 5.3.3.1 su prikazani deskriptivni statistički parametri za aktivnost mijeloperoksidaze u neutrofilnim granulocitima mlečnih krava uključenih u ispitivanja.

Tabela 5.3.3.1. Aktivnost mijeloperoksidaze (MPO) u neutrofilnim granulocitima mlečnih krava (ng/ml)

Termini uzorkovanja	Nedelje do/od teljenja	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
I	-3	10	3,41	20,07	3,27	109,35%	30,01	1,60
II	-2	10	13,10	22,12	3,43	71,50%	34,70	5,82
III	-1	10	25,80 ^{xy}	16,75	3,4	41,17%	46,40	11,03
IV	+1	10	20,98 ^{zq}	14,10	2,99	44,33%	37,95	3,90
V	+2	10	11,10	9,44	2,73	75,42%	35,95	2,31
VI	+3	10	2,50 ^{xz}	4,89	1,80	126,90%	21,30	0,40
VII	+6	10	0,87 ^{yq}	6,30	4,33	192,19%	43,43	0,00

Ista mala slova x, y, z, q ukazuju na vrlo signifikantnu razliku ($p < 0,01$)

Radi bolje preglednosti, rezultati merenja su prikazani i grafički.



Grafikon 5.3.3.1a. Prosečne vrednosti aktivnosti mijeloperoksidaze, interkvartilne razlike (IQR) u krvi krava u sedam različitih termina u peripartalnom periodu $p < 0,01$ (**)

Analizom aktivnosti enzima mijeloperoksidaze (MPO) ustanovljena su velika variranja tako da su primenjivani neparametrijski statistički testovi. Najmanja prosečna aktivnost MPO je izmerena u šestoj nedelji nakon teljenja ($0,87 \pm 6,30$ mg/ml), a najveća u nedelji pred teljenje ($25,80 \pm 16,75$ mg/ml). Prosečne vrednosti u trećoj i šestoj nedelji nakon teljenja su bile signifikantno manje ($p < 0,01$) u odnosu na vrednosti izmerene u prvoj nedelji pre i prvoj nedelji posle teljenja. Najveći koeficijent varijacije je zabeležen u šestoj nedelji nakon teljenja (192,19 %), a najmanji u prvoj nedelji pre teljenja (41,17 %).

5.4. Ocena telesne kondicije krava uključenih u ispitivanja

U okviru ove disertacije je ocenjivana i telesna kondicija svih mlečnih krava uključenih u ogled i to: tri nedelje pre, kao i šest nedelja posle teljenja. Poznato je da negativan energetska bilans krava, praćen promenama vrednosti pojedinih biohemijskih parametara u krvi, može imati uticaja na funkcije neutrofilnih granulocita tako da smo iz tog razloga ovaj pristup smatrali opravdanim.

U tabeli 5.4.1. su prikazani rezultati ocene telesne kondicije kod svih mlečnih krava uključenih u ispitivanja, tri nedelje pre i šest nedelja posle teljenja i matematička procena gubitaka telesne mase.

Tabela 5.4.1. Rezultati ocene telesne kondicije mlečnih krava uključenih u ispitivanja, tri nedelje pre i šest nedelja posle teljenja

	OTK		Razlika
	-3	+6	
1	4,00	3,75	-0,25
2	3,50	4,00	0,50
3	3,50	3,00	-0,50
4	3,75	3,25	-0,50
5	3,50	3,75	0,25
6	4,00	3,75	-0,25
7	3,50	3,50	0,00
8	3,75	2,50	-1,25
9	3,75	3,25	-0,50
10	3,50	3,75	0,25
11	3,25	2,25	-1,00
12	3,50	3,00	-0,50
13	3,25	2,50	-0,75
14	3,75	3,75	0,00
15	3,50	3,75	0,25
16	3,50	3,25	-0,25
17	4,00	3,75	-0,25
18	4,25	4,00	-0,25
19	3,25	2,50	-0,75
20	3,75	3,50	-0,25
21	4,00	3,50	-0,50
X	3,65	3,35	

Najmanja vrednost OTK tri nedelje pre teljenja je iznosila 3,25, a najveća 4,25. Šest nedelja posle teljenja, najmanja vrednost OTK iznosila je 2,25, a najveća 4,00. Najveća razlika u vrednosti OTK u posmatranom intervalu je bila 1,25. Razlike u srednjim vrednostima telesne kondicije mlečnih krava uključenih u ogled, tri nedelje pre i šest nedelja posle teljenja nisu bile statistički značajne ($p>0,05$).

5.5. Uticaj egzogenih faktora na funkcionalnu aktivnost neutrofilnih granulocita

5.5.1. Rezultati određivanja procenta neutrofilnih granulocita koji su reagovali fagocitozom posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum[®] nedelju dana pre i nedelju dana posle teljenja

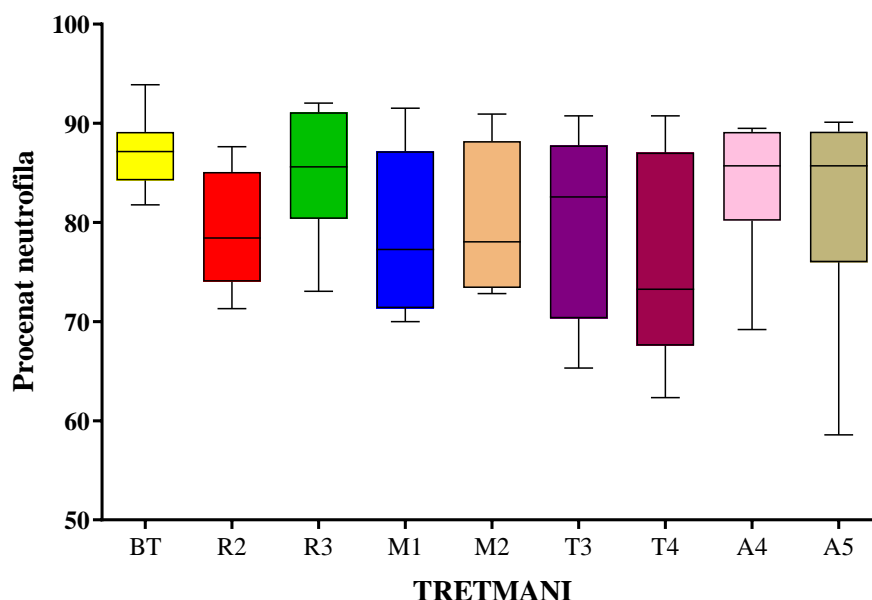
U tabeli 5.5.1.1. su izneti deskriptivni statistički parametri za procenat neutrofilnih granulocita koji su reagovali fagocitozom izračunati nakon dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum[®] punoj krvi mlečnih krava u nedelji pre teljenja.

Tabela 5.5.1.1. Procenat neutrofilnih granulocita koji su reagovali fagocitozom posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum® u nedelji pre teljenja.

Tretmani	N	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
BT	6	87,15	4,87	1,62	4,55	93,88	81,78
R2	6	78,42	11,06	2,45	7,57	87,65	71,30
R3	6	85,61	10,77	2,78	8,02	92,04	73,06
M1	6	77,29	15,82	3,40	10,54	91,53	70,00
M2	6	75,32	23,64	7,41	24,67	90,94	39,74
T3	6	82,58	17,43	3,95	12,09	90,76	65,31
T4	6	73,27	19,47	4,37	14,12	90,76	62,33
A4	6	85,73	8,96	3,06	8,93	89,49	69,21
A5	6	85,72	13,17	4,83	14,45	90,10	58,59

R2 - 0,05% Rtanjski čaj; R3 - 0,025% Rtanjski čaj; M1 - 0,1% menta; M2 - 0,05% menta; T3 - 0,025% timijan; T4 - 0,0125% timijan, A4 - Armenicum® 1:800; A5 - Armenicum® 1:1600; BT- bez tretmana.

Radi bolje preglednosti, rezultati su predstavljani i na grafikonu 5.5.1.1a.



Grafikon 5.5.1.1a. Srednje vrednosti procenta neutrofilnih granulocita koji su reagovali fagocitozom i interkvartilne razlike (IQR) u krvi krava za osam različitih tretmana nedelju dana pre teljenja

Najmanja srednja vrednost procenta neutrofilnih granulocita koji su reagovali fagocitozom je registrovana u tretmanu T4 (73,27±19,47 %), a najveća u uzorku bez tretmana (87,15±4,87 %). Analizom sttističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima posmatranog parametra nisu ustanovljene signifikantne razlike u odnosu na primenjene tretmane ($p > 0,05$). Najveći koeficijent varijacije je zabeležen u tretmanu M2 (24,67 %), a najmanji u uzorku bez tretmana (4,55 %).

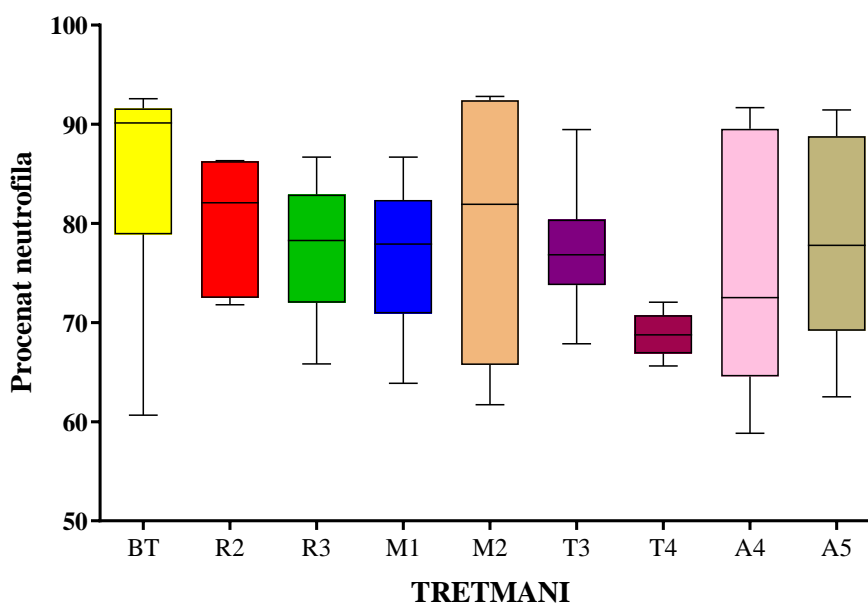
Deskriptivni statistički parametri za procenat neutrofilnih granulocita koji su reagovali fagocitozom izračunati nakon dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum® punoj krvi mlečnih krava u nedelji posle teljenja prikazani su u tabeli 5.5.1.2.

Tabela 5.5.1.2. Procenat neutrofilnih granulocita koji su reagovali fagocitozom posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta u preparata Armenicum® u nedelji posle teljenja

Tretmani	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
BT	6	90,13	12,71	4,97	14,33	92,59	60,67
R2	6	82,08	13,80	2,67	8,17	86,32	71,80
R3	6	78,28	10,92	2,90	9,17	86,68	65,83
M1	6	77,93	11,46	3,16	10,08	86,68	63,88
M2	6	81,94	26,71	5,27	16,23	92,81	61,71
T3	6	76,84	6,60	2,83	8,95	89,47	67,87
T4	6	68,77	3,86	0,91	3,26	72,05	65,63
A4	6	72,53	24,99	5,26	17,14	91,69	58,83
A5	6	77,79	19,61	4,33	13,57	91,44	62,52

R2 - 0,05% Rtanjski čaj; R3 - 0,025% Rtanjski čaj; M1 - 0,1% menta; M2 - 0,05% menta; T3 - 0,025% timijan; T4 - 0,0125% timijan, A4 - Armenicum® 1:800; A5 - Armenicum® 1:1600; BT- bez tretmana.

Radi bolje preglednosti, rezultati merenja su prikazani i grafički.



Grafikon 5.5.1.2a. Srednje vrednosti procenta neutrofilnih granulocita koji su reagovali fagocitozom i interkvartilne razlike (IQR) u krvi krava za osam različitih tretmana nedelju dana posle teljenja

Najmanja srednja vrednost procenta neutrofilnih granulocita koji su reagovali fagocitozom bila u tretmanu T4 ($68,77 \pm 3,86$ %), a najveća u uzorku bez tretmana ($90,13 \pm 12,71$ %). Analizom razlika u srednjim vrednostima ovog parametra nisu ustanovljene

signifikantne razlike u odnosu na primenjene tretmane ($p>0,05$). Najveći koeficijent varijacije je zabeležen u tretmanu A4 (17,14%), a najmanji u T4 tretmanu (3,26%).

Dodatne statističke analize su izvršene neparametrijskim testom rangova međusobnim poređenjem vrednosti registrovanih posle tretmana ekstraktima i preparatom Armenicum[®] u nedelji pre i nedelji posle teljenja. Tom prilikom nisu ustanovljene signifikantne razlike između posmatranih vrednosti ($p>0,05$) što ukazuje da nije bilo signifikantnih razlika između srednjih vrednosti procenta neutrofilnih granulocita koji su reagovali fagocitozom (dobijenih Phagotestom[®]) posle dodavanja etarskih ulja i preparata Armenicum[®] nedelju dana pre u odnosu na nedelju dana posle teljenja. Rezultati ove analize su dati u tabeli 5.5.1.3.

Tabela 5.5.1.3. Rang test za procenat neutrofilnih granulocita koji su reagovali fagocitozom u tretmanima pre i nakon teljenja

Tretmani pre i posle teljenja	Sredine rangova 1	Sredine rangova 2	Razlika sredina rangova
BT- sa BT+	80,50	77,58	2,917
R2- sa R2+	51,83	54,92	-3,083
R3- sa R3+	73,00	46,92	26,08
M1- sa M1+	51,58	44,92	6,667
M2- sa M2+	48,67	58,33	-9,667
T3- sa T3+	56,42	45,67	10,75
T4- sa T4+	42,92	18,00	24,92
A4- sa A4+	68,00	43,83	24,17
A5- sa A5+	65,58	52,33	13,25

R2 - 0,05% Rtanjski čaj; R3 - 0,025% Rtanjski čaj; M1 - 0,1% menta; M2 - 0,05% menta; T3 - 0,025% timijan; T4 - 0,0125% timijan, A4 - Armenicum[®] 1:800; A5 - Armenicum[®] 1:1600; BT- bez tretmana.

5.5.2. Rezultati određivanja intenziteta fluorescencije neutrofilnih granulocita koji su reagovali fagocitozom posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum[®] nedelju dana pre i nedelju dana posle teljenja

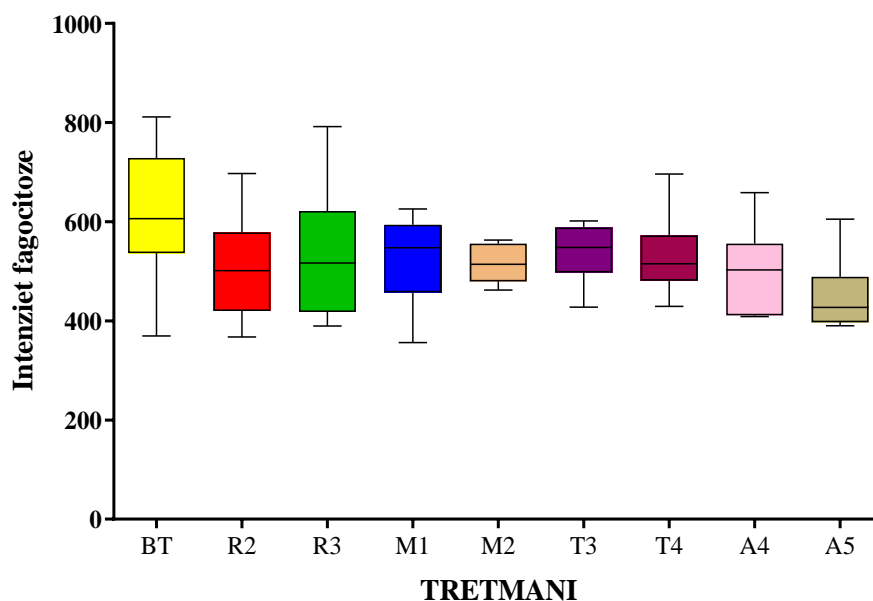
U tabeli 5.5.2.1. su izneti deskriptivni statistički parametri za intenzitet fluorescencije neutrofilnih granulocita koji su reagovali fagocitozom nakon dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum[®] punoj krvi mlečnih krava nedelju dana pre teljenja.

Tabela 5.5.2.1. Intenzitet fluorescencije neutrofilnih granulocita koji su reagovali fagocitozom, posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum® u nedelji pre teljenja

Tretmani	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
BT	6	606,50	191,80	59,70	23,79	811,60	536,80
R2	6	501,30	158,70	45,32	21,88	697,10	419,80
R3	6	516,70	203,70	57,97	26,57	791,80	418,00
M1	6	547,70	136,70	38,84	18,11	625,90	457,40
M2	6	514,40	76,00	15,72	7,47	562,80	479,70
T3	6	547,90	90,70	25,18	11,46	601,40	497,60
T4	6	515,00	90,90	36,36	16,78	696,30	481,30
A4	6	502,70	144,60	37,27	18,22	658,60	411,20
A5	6	427,10	91,40	32,50	17,69	605,40	397,40

R2 - 0,05% Rtanjski čaj; R3 - 0,025% Rtanjski čaj; M1 - 0,1% menta; M2 - 0,05% menta; T3 - 0,025% timijan; T4 - 0,0125% timijan, A4 - Armenicum® 1:800; A5 - Armenicum® 1:1600; BT- bez tretmana.

Radi bolje preglednosti rezultati su predstavljeni i na grafikonu 5.5.2.1a.



Grafikon br. 5.5.2.1a. Srednje vrednosti intenziteta fluorescencije neutrofilnih granulocita koji su reagovali fagocitozom, interkvartilne razlike (IQR) u krvi krava, pod uticajem osam različitih tretmana nedelju dana pre teljenja

Najmanji prosečan intenzitet fluorescencije neutrofilnih granulocita koji su reagovali fagocitozom, nakon dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum® punoj krvi mlečnih krava, u nedelji pre teljenja, je zabeležen u tretmanu A5 (427,10±91,40), a najveći u uzorcima bez tretmana (606,50±191,80). Analizom statističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima ovog parametra nisu ustanovljene signifikantne razlike u odnosu na tretmane ispitivanja ($p > 0,05$). Najveći koeficijent varijacije je registrovan u tretmanu R3 (26,57%), a najmanji u tretmanu M2 (7,47%).

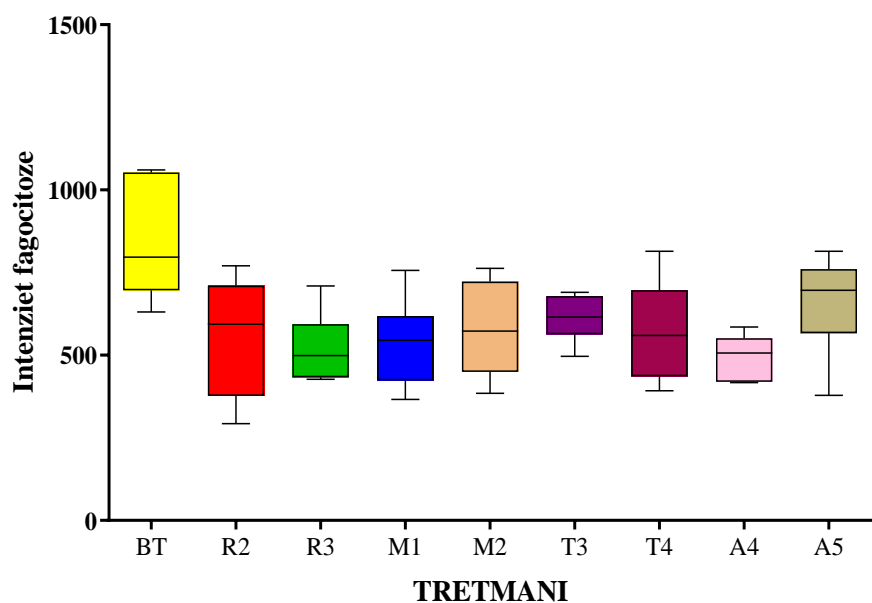
U tabeli 5.5.2.2. su izneti deskriptivni statistički parametri za intenzitet fluorescencije neutrofilnih granulocita koji su reagovali fagocitozom nakon dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum® punoj krvi mlečnih krava u nedelji posle teljenja.

Tabela 5.5.2.2. Intenzitet fluorescencije neutrofilnih granulocita koji su reagovali fagocitozom, posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum® u nedelji posle teljenja

Tretmani	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
BT	6	796,70 ^a	356,50	72,88	21,19	1061,00	696,50
R2	6	594,00	332,90	73,35	32,22	770,20	377,00
R3	6	498,60	161,00	42,83	20,15	709,70	432,90
M1	6	545,40	194,50	54,13	24,64	756,90	423,90
M2	6	573,30	273,00	57,84	24,47	762,80	449,80
T3	6	615,50	115,20	28,37	11,33	690,30	563,80
T4	6	559,70	260,30	61,53	26,33	814,20	436,30
A4	6	506,90 ^a	131,70	27,25	13,46	585,10	419,60
A5	6	696,60	193,60	62,24	23,11	814,10	566,90

R2 - 0,05% Rtanjski čaj; **R3** - 0,025% Rtanjski čaj; **M1** - 0,1% menta; **M2** - 0,05% menta; **T3** - 0,025% timijan; **T4** - 0,0125% timijan, **A4** - Armenicum® 1:800; **A5** - Armenicum® 1:1600; **BT**- bez tretmana; ista mala slova a, ukazuju na signifikantnu razliku, $p < 0,05$.

Radi bolje preglednosti, rezultati merenja su prikazani i grafički.



Grafikon 5.5.2.2a. Srednje vrednosti intenziteta fluorescencije neutrofilnih granulocita koji su reagovali fagocitozom i interkvartilne razlike (IQR) u krvi krava, pod uticajem osam različitih tretmana - nedelju dana posle teljenja

Najmanji prosečan intenzitet fluorescencije neutrofilnih granulocita je registrovan u tretmanu R3 (498,60±161,00), a najveći u grupi bez tretmana (796,70±356,50). Ustanovljene su statistički signifikantne razlike ($p < 0,05$) između prosečnog intenziteta fluorescencije neutrofilnih granulocita bez tretmana i tretmana T4. Analizom statističke značajnosti razlika u

srednjim vrednostima nisu ustanovljene signifikantne razlike između ostalih tretmana ($p>0,05$). Najveći koeficijent varijacije je zabeležen u tretmanu R2 (32,22%), a najmanji u tretmanu T3 (11,33%).

Kao i u prethodnom slučaju, dodatne statističke analize su izvršene neparametrijskim testom rangova međusobnim poređenjem vrednosti registrovanih posle tretmana ekstraktima i preparatom Armenicum[®] nedelju dana pre i nedelju dana posle teljenja. Ovi rezultati su izneti u tabeli 5.5.2.3.

Tabela br. 5.5.2.3. Rang test srednjih vrednosti intenziteta fluorescencije neutrofilnih granulocita, koji su reagovali fagocitozom nedelju dana pre i nedelju dana posle teljenja

Tretmani pre i posle teljenja	Sredine rangova 1	Sredine rangova 2	Razlika sredine rangova
BT- sa BT+	70,83	99,50	-28,67
R2- sa R2+	41,00	57,50	-16,50
R3- sa R3+	46,75	44,67	2,083
M1- sa M1+	49,33	50,33	-1,000
M2- sa M2+	44,00	60,17	-16,17
T3- sa T3+	53,92	73,17	-19,25
T4- sa T4+	47,33	58,17	-10,83
A4- sa A4+	39,67	39,50	0,1667
A5- sa A5+	26,83	78,33	-51,50 ^a

R2 - 0,05% Rtanjski čaj; **R3** - 0,025% Rtanjski čaj; **M1** - 0,1% menta; **M2** - 0,05% menta; **T3** - 0,025% timijan; **T4** - 0,0125% timijan, **A4** - Armenicum[®] 1:800; **A5** - Armenicum[®] 1:1600; **BT**- bez tretmana; malo slovo a, ukazuje na signifikantnu razliku, $p<0,05$.

Rezultati dobijeni ovim testom ukazuju da postoji signifikantna razlika ($p<0,05$) između prosečnog intenziteta fluorescencije neutrofilnih granulocita koji su reagovali fagocitozom u tretmanu A5, sedam dana pre i sedam dana posle teljenja. Između srednjih vrednosti zabeleženih nakon ostalih tretmana nisu ustanovljene signifikantne razlike ($p>0,05$).

5.5.3. Rezultati određivanja indeksa fagocitoze neutrofilnih granulocita posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum[®] nedelju dana pre i nedelju dana posle teljenja

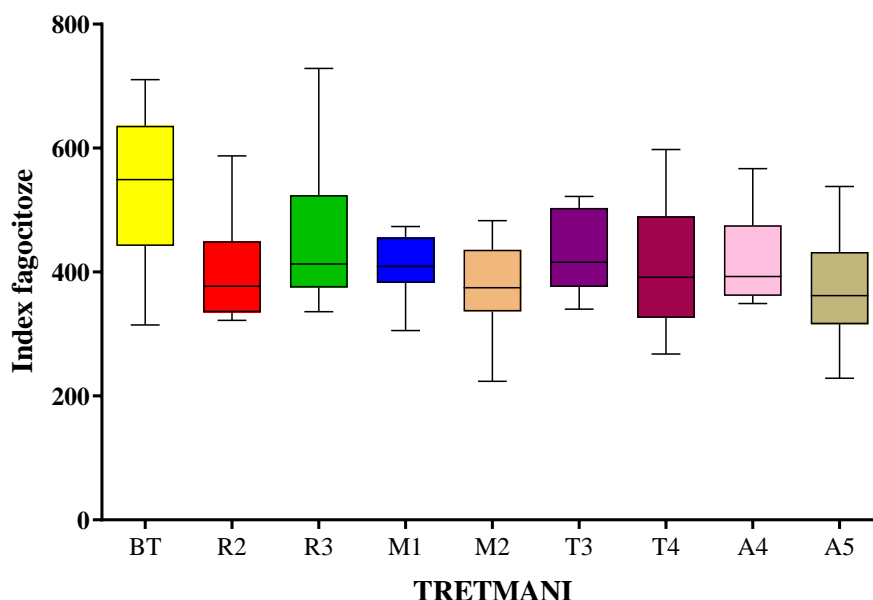
U tabeli 5.5.3.1. su izneti rezultati dobijeni izračunavanjem indeksa fagocitoze neutrofilnih granulocita nakon dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum[®] punoj krvi mlečnih krava, u nedelji pre teljenja kao i odgovarajući deskriptivni statistički parametri.

Tabela 5.5.3.1. Indeks fagocitoze neutrofilnih granulocita posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum® nedelju dana pre teljenja

Tretmani	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
BT	6	549,10	193,90	54,28	24,78	710,40	314,60
R2	6	377,20	114,50	39,58	24,16	587,30	322,20
R3	6	412,90	148,80	56,89	30,58	728,70	336,00
M1	6	409,30	72,80	23,47	14,05	473,40	305,40
M2	6	374,60	99,70	34,93	22,82	483,00	223,70
T3	6	415,70	127,30	28,05	15,99	521,90	340,20
T4	6	391,40	163,60	45,73	27,46	597,60	267,60
A4	6	392,70	114,00	33,16	19,39	566,80	349,10
A5	6	362,00	116,20	40,78	26,85	538,00	228,50

R2 - 0,05% Rtanjski čaj; R3 - 0,025% Rtanjski čaj; M1 - 0,1% menta; M2 - 0,05% menta; T3 - 0,025% timijan; T4 - 0,0125% timijan, A4 - Armenicum® 1:800; A5 - Armenicum® 1:1600; BT- bez tretmana.

Radi bolje preglednosti, rezultati merenja su prikazani i grafički.



Grafikon 5.5.3.1a. Srednje vrednosti indeksa fagocitoze kod neutrofilnih granulocita i interkvartilne razlike (IQR) u krvi krava, pod uticajem osam različitih tretmana nedelju dana pre teljenja

Najmanji prosečan indeks fagocitoze neutrofilnih granulocita je uočen u tretmanu A5 (362,00±116,20), a najveći u uzorcima bez tretmana (549,10±193,90). Analizom statističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima ovog parametra nisu ustanovljene signifikantne razlike u odnosu na primenjene tretmane ($p > 0,05$). Najveći koeficijent varijacije je registrovan u tretmanu R3 (30,58%), a najmanji u tretmanu M1 (14,05%).

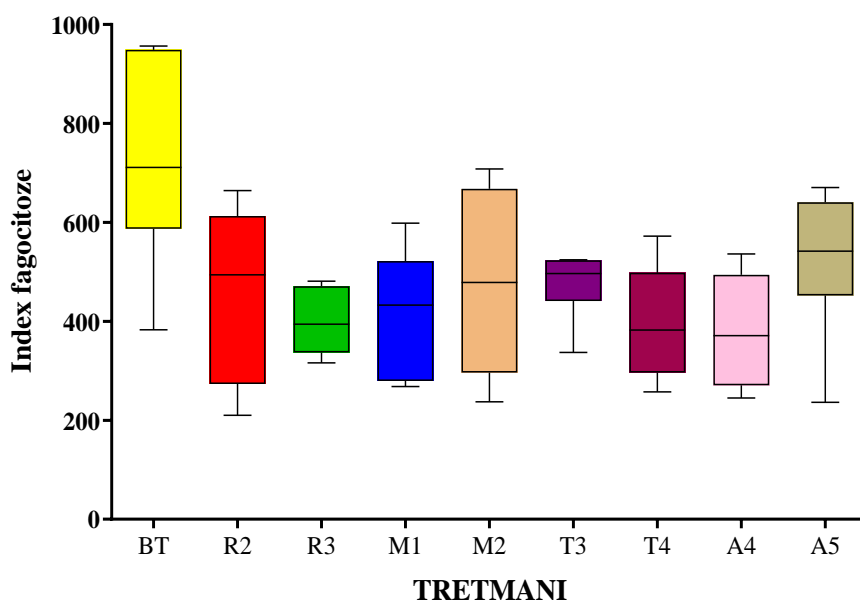
Deskriptivni statistički parametri za indeks fagocitoze neutrofilnih granulocita izračunati nakon dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum® punoj krvi mlečnih krava u nedelji posle teljenja prikazani su u tabeli 5.5.3.2.

Tabela 5.5.3.2. Indeks fagocitoze neutrofilnih granulocita, posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum® nedelju dana posle teljenja

Tretmani	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
BT	6	711,30	361,30	86,66	29,19%	956,50	382,80
R2	6	494,00	339,20	71,82	38,35%	664,60	210,20
R3	6	394,40	133,60	26,72	16,38%	481,40	316,10
M1	6	432,90	242,30	51,71	30,26%	598,70	268,10
M2	6	478,50	371,60	74,90	38,31%	708,00	237,20
T3	6	496,70	82,40	29,23	15,06%	524,50	337,00
T4	6	382,20	201,50	46,39	28,67%	572,40	257,30
A4	6	371,30	222,90	45,82	29,49%	536,50	245,40
A5	6	542,00	188,00	62,29	29,10%	670,80	236,60

R2 - 0,05% Rtanjski čaj; R3 - 0,025% Rtanjski čaj; M1 - 0,1% menta; M2 - 0,05% menta; T3 - 0,025% timijan; T4 - 0,0125% timijan, A4 - Armenicum® 1:800; A5 - Armenicum® 1:1600; BT- bez tretmana.

Dobijeni rezultati su prikazani i na grafikonu 5.5.3.1a.



Grafikon 5.5.3.2a. Srednje vrednosti indeksa fagocitoze kod neutrofilnih granulocita i interkvartilne razlike (IQR) u krvi krava, pod uticajem osam različitih tretmana nedelju dana posle teljenja

Najmanji prosečan indeks fagocitoze neutrofilnih granulocita je registrovan u tretmanu A4 (371,30±222,90), a najveći u uzorcima bez tretmana (771,30±361,30). Analizom statističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima ovog parametra nisu ustanovljene signifikantne razlike u odnosu na tretmane ispitivanja ($p > 0,05$). Najveći koeficijent varijacije je uočen posle tretmana R2 i M2 (38,35% i 38,31%) a najmanji posle tretmana T3 (15,06%).

Neparametrijskim testom rangova nisu ustanovljene signifikantne razlike ($p > 0,05$) u registrovanim vrednostima prosečnih vrednosti indeksa fagocitoze neutrofilnih granulocita dobijenih Phagotestom® nakon upotrebe biljnih ekstrakta i preparata Armenicum® nedelju

dana pre u odnosu na nedelju dana posle teljenja. Rezultati ovog testa su prikazani u tabeli 5.5.3.3.

Tabela 5.5.3.3. Rang test indeksa fagocitoze neutrofilnih granulocita nedelju dana pre i nedelju dana posle teljenja

Tretmani pre i posle teljenja	Sredine rangova 1	Sredine rangova 2	Razlika sredine rangova
BT- sa BT+	77,50	93,33	-15,83
R2- sa R2+	42,17	58,83	-16,67
R3- sa R3+	56,00	44,00	12,00
M1- sa M1+	48,83	51,00	-2,167
M2- sa M2+	39,83	60,67	-20,83
T3- sa T3+	53,83	66,17	-12,33
T4- sa T4+	45,67	42,33	3,333
A4- sa A4+	48,67	40,00	8,667
A5- sa A5+	36,33	75,83	-39,50

R2 - 0,05% Rtanjski čaj; **R3** - 0,025% Rtanjski čaj; **M1** - 0,1% menta; **M2** - 0,05% menta; **T3** - 0,025% timijan; **T4** - 0,0125% timijan, **A4** - Armenicum® 1:800; **A5** - Armenicum® 1:1600; **BT**- bez tretmana.

5.5.4. Rezultati određivanja procenta neutrofilnih granulocita koji su reagovali respiratornim praskom posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum® nedelju dana pre i posle teljenja

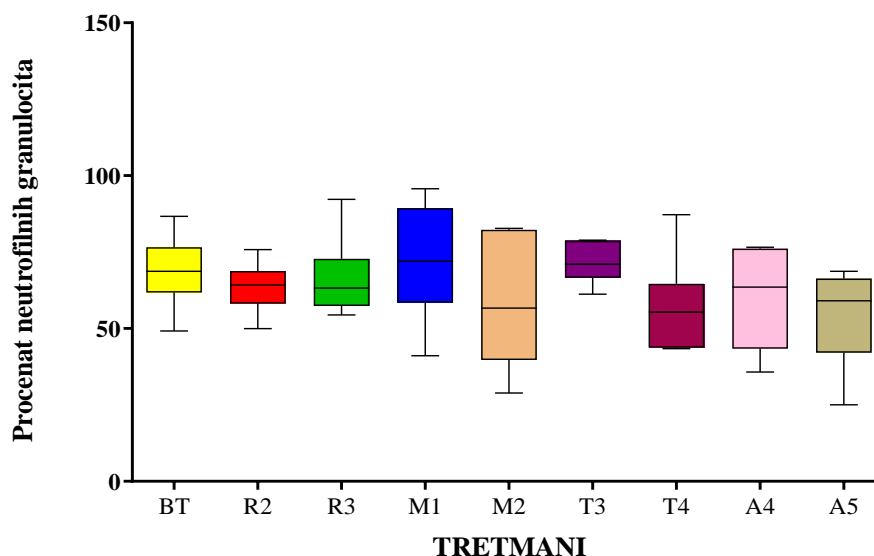
U tabeli 5.5.4.1. su prikazani su deskriptivni statistički parametri za procenat neutrofilnih granulocita koji su reagovali respiratornim praskom posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum® nedelju dana pre teljenja.

Tabela 5.5.4.1. Procenat neutrofilnih granulocita koji su reagovali respiratornim praskom posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum® nedelju dana pre teljenja

Tretmani	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
BT	6	68,74	14,80	4,94	17,59%	86,67	49,19
R2	6	64,23	10,60	3,42	13,17%	75,79	49,98
R3	6	63,23	15,38	5,47	20,21%	92,23	54,44
M1	6	72,05	30,79	7,76	26,39%	95,70	41,05
M2	6	56,67	42,63	8,70	36,49%	82,79	28,87
T3	6	71,06	12,07	2,71	9,29%	78,91	61,25
T4	6	55,35	20,84	6,52	28,02%	87,24	43,44
A4	6	63,53	32,70	6,73	27,37%	76,57	35,80
A5	6	59,04	24,24	6,64	30,03%	68,71	25,05

R2 - 0,05% Rtanjski čaj; **R3** - 0,025% Rtanjski čaj; **M1** - 0,1% menta; **M2** - 0,05% menta; **T3** - 0,025% timijan; **T4** - 0,0125% timijan, **A4** - Armenicum® 1:800; **A5** - Armenicum® 1:1600; **BT**- bez tretmana.

Radi bolje preglednosti, rezultati merenja su prikazani i grafički.



Grafikon 5.5.4.1a. Srednje vrednosti procenta neutrofilnih granulocita koji su reagovali respiratornim praskom i standardne devijacije (SD) u krvi krava, pod uticajem osam različitih tretmana nedelju dana pre teljenja

Analizirajući vrednosti procenta neutrofilnih granulocita, koji su ispoljili aktivnost respiratornog praska nakon fagocitoze *E. coli*, posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum[®], nedelju dana pre teljenja, ustanovljena je najmanja srednja vrednost ovog parametra u tretmanu T4 ($55,35 \pm 20,84$ %), a najveća u tretmanu M2 ($72,05 \pm 30,79$ %). Analizom statističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima ovog parametra nisu ustanovljene signifikantne razlike u odnosu na druge primenjene tretmane ($p > 0,05$). Najveći koeficijent varijacije je zabeležen u tretmanu M2 (36,49%), a najmanji u tretmanu T3 (9,29%).

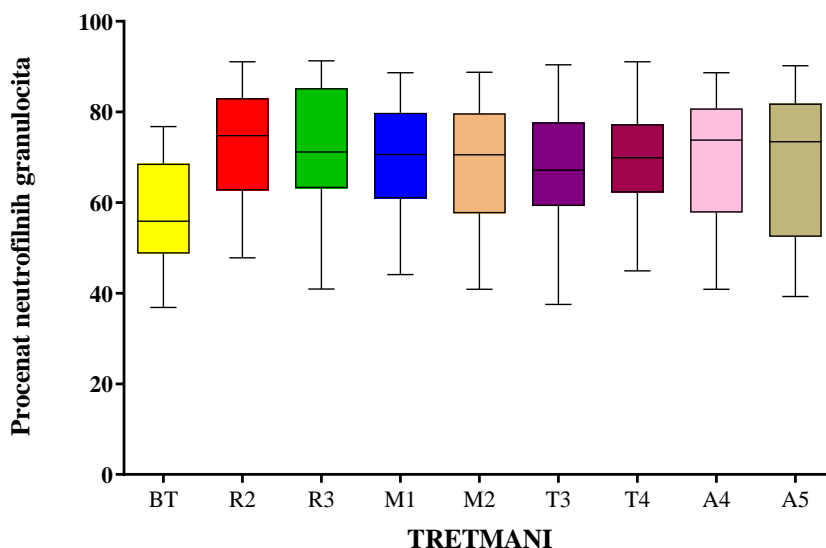
Deskriptivni statistički parametri za procenat neutrofilnih granulocita koji su reagovali respiratornim praskom posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum[®] nedelju dana posle teljenja prikazani su u tabeli 5.5.4.2.

Tabela 5.5.4.2. Procenat neutrofilnih granulocita koji su reagovali respiratornim praskom posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum® nedelju dana posle teljenja

Tretmani	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
BT	6	55,91	19,86	5,48	23,42	76,80	36,84
R2	6	74,75	20,39	5,94	20,02	91,10	47,79
R3	6	71,16	22,05	6,99	23,98	91,27	40,90
M1	6	70,59	18,91	6,00	21,12	88,64	44,10
M2	6	70,56	22,09	6,55	23,43	88,76	40,89
T3	6	67,16	18,48	6,97	25,48	90,40	37,52
T4	6	69,88	15,08	6,00	21,20	91,08	44,94
A4	6	73,81	23,01	6,75	23,69	88,66	40,89
A5	6	73,42	29,43	7,45	26,57	90,21	39,27

R2 - 0,05% Rtanjski čaj; R3 - 0,025% Rtanjski čaj; M1 - 0,1% menta; M2 - 0,05% menta; T3 - 0,025% timijan; T4 - 0,0125% timijan, A4 - Armenicum® 1:800; A5 - Armenicum® 1:1600; BT- bez tretmana.

Najmanja srednja vrednost procenta neutrofilnih granulocita koji su ispoljili aktivnost respiratornog praska pod uticajem različitih tretmana je zabeležena u uzorcima bez tretmana ($55,91 \pm 19,86$ %), a najveća srednja vrednost je registrovana u tretmanu R2 ($74,75 \pm 20,39$ %). Nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike u odnosu na tretmane ispitivanja ($p > 0,05$). Najveći koeficijent varijacije je registrovan u tretmanu A5 (26,57%), a najmanji u tretmanu R2 (20,02%). Radi bolje preglednosti, dobijeni rezultati su prikazani i na grafikonu 5.5.4.2a.



Grafikon 5.5.4.2a. srednje vrednosti procenta neutrofilnih granulocita koji su ispoljili respiratorni prasak i interkvartilne razlike (IQR) u krvi krava, pod uticajem osam različitih tretmana nedelju dana posle teljenja

Na osnovu neparametrijskog testa rangova (Tabela 5.5.4.3.) nisu ustanovljene signifikantne razlike ($p > 0,05$) između srednjih vrednosti procenta neutrofilnih granulocita koji

su ispoljili aktivnost respiratornog praska dobijenih Phagoburst[®] testom posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum[®], nedelju dana pre u odnosu na nedelju dana posle teljenja.

Tabela 5.5.4.3. Rang test procenta neutrofilnih granulocita koji su ispoljili aktivnost respiratornog praska

Tretmani pre i posle teljenja	Sredine rangova 1	Sredine rangova 2	Razlika sredine rangova
BT- sa BT+	59,83	34,67	25,17
R2- sa R2+	44,00	71,33	-27,33
R3- sa R3+	47,67	69,00	-21,33
M1- sa M1+	66,83	63,67	3,167
M2- sa M2+	43,00	59,75	-16,75
T3- sa T3+	67,67	56,50	11,17
T4- sa T4+	34,00	62,67	-28,67
A4- sa A4+	44,00	63,92	-19,92
A5- sa A5+	30,50	62,00	-31,50

R2 - 0,05% Rtanjski čaj; **R3** - 0,025% Rtanjski čaj; **M1** - 0,1% menta; **M2** - 0,05% menta; **T3** - 0,025% timijan; **T4** - 0,0125% timijan; **A4** - Armenicum[®] 1:800; **A5** - Armenicum[®] 1:1600; **BT**- bez tretmana.

5.5.5. Rezultati određivanja intenziteta fluorescencije tokom respiratornog praska neutrofilnih granulocita posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum[®] nedelju dana pre i nedelju dana posle teljenja

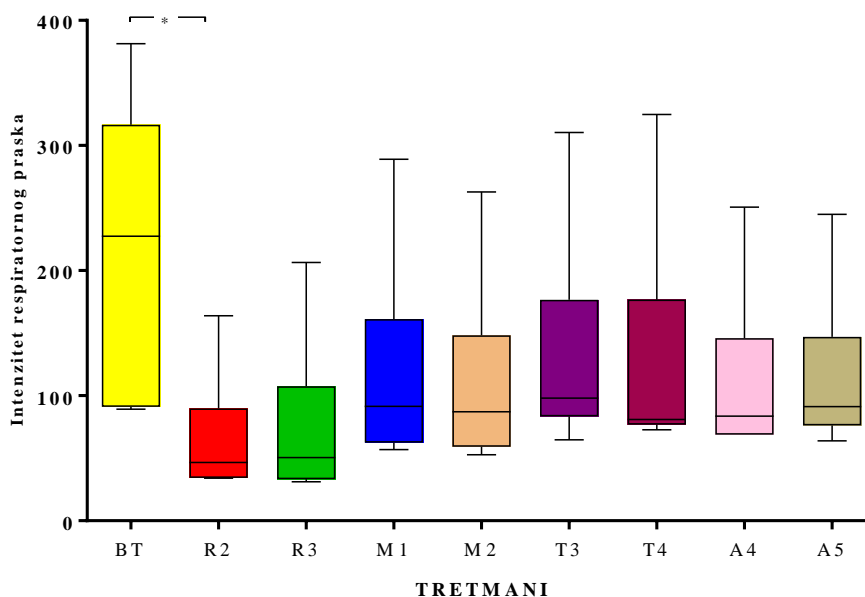
U tabeli 5.5.5.1. su izneti rezultati dobijeni izračunavanjem intenzitet fluorescencije neutrofilnih granulocita tokom respiratornog praska nakon dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum[®] punoj krvi mlečnih krava, u nedelji pre teljenja kao i odgovarajući deskriptivni statistički parametri.

Tabela 5.5.5.1. Intenzitet fluorescencije tokom respiratornog praska neutrofilnih granulocita posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum[®] nedelju dana pre teljenja

Tretmani	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
BT	6	227,50 ^a	225,54	46,7200	52,33	381,40	89,22
R2	6	46,52 ^a	55,52	20,3000	76,42	163,80	34,14
R3	6	50,45	74,29	27,2300	89,57	206,40	31,21
M1	6	91,49	98,86	35,4100	73,09	289,10	56,99
M2	6	87,08	89,10	32,1000	71,35	262,80	52,68
T3	6	97,98	93,22	36,7200	68,06	310,40	64,81
T4	6	80,90	99,93	40,2800	77,38	324,80	72,78
A4	6	83,61	77,09	28,7400	63,35	250,70	68,75
A5	6	91,22	70,87	27,0400	57,96	245,00	63,82

R2 - 0,05% Rtanjski čaj; **R3** - 0,025% Rtanjski čaj; **M1** - 0,1% menta; **M2** - 0,05% menta; **T3** - 0,025% timijan; **T4** - 0,0125% timijan, **A4** - Armenicum[®] 1:800; **A5** - Armenicum[®] 1:1600; **BT**- bez tretmana; ista mala slova a, ukazuju na signifikantnu razliku, $p < 0,05$.

Grafički prikaz rezultata predstavljenih u tabeli, jasno ukazuje na razlike između pojedinih tretmana.



Grafikon 5.5.5.1a. Srednje vrednosti intenziteta fluorescencije neutrofilnih granulocita pri respiratornom prasku, interkvartilne razlike (IQR) u krvi krava, pod uticajem osam različitih tretmana nedelju dana pre teljenja

Prosečan intenzitet fluorescencije tokom respiratornog praska neutrofilnih granulocita je bio najmanji u tretmanu R2 ($46,52 \pm 55,52$), a najveći u uzorcima bez tretmana ($227,50 \pm 225,54$) i između ovih vrednosti su ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p < 0,05$). Između ostalih tretmana te razlike nisu ustanovljene ($p > 0,05$). Variranje vrednosti ovog parametra je bilo veliko tako da je najveći koeficijent varijacije zabeležen u tretmanu R3 (89,57%), a najmanji u uzorcima bez tretmana (52,33%).

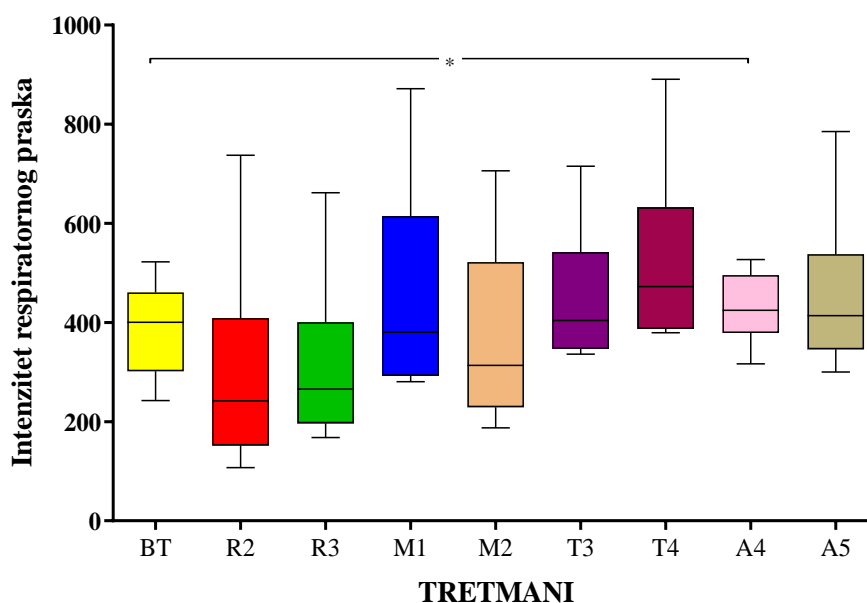
Intenzitet fluorescencije tokom respiratornog praska posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum[®] nedelju dana posle teljenja i odgovarajući deskriptivni statistički parametri prikazani su u tabeli 5.5.5.2.

Tabela 5.5.5.2. Intenzitet fluorescencije neutrofilnih granulocita tokom respiratornog prasaka posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum® nedelju dana posle teljenja

Tretmani	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
BT	6	400,20	158,70	39,5100	24,96%	522,10	242,60
R2	6	241,90	256,50	92,2900	75,58%	737,40	107,00
R3	6	265,50	203,70	72,9600	57,03%	661,60	168,20
M1	6	380,30	322,00	92,6000	49,71%	871,60	280,70
M2	6	313,50	292,80	78,1900	51,67%	705,80	187,30
T3	6	404,20	195,30	58,5200	31,92%	715,40	336,40
T4	6	472,40	244,90	78,4800	36,61%	890,70	379,10
A4	6	424,60	116,70	29,5900	16,87%	527,00	316,80
A5	6	414,00	191,50	69,6800	37,51%	785,30	300,20

R2 - 0,05% Rtanjski čaj; R3 - 0,025% Rtanjski čaj; M1 - 0,1% menta; M2 - 0,05% menta; T3 - 0,025% timijan; T4 - 0,0125% timijan, A4 - Armenicum® 1:800; A5 - Armenicum® 1:1600; BT- bez tretmana.

Radi bolje preglednosti, rezultati merenja su prikazani i grafički.



Grafikon 5.5.5.2a. Srednje vrednosti intenziteta fluorescencije neutrofilnih granulocita pri respiratornom prasaku i interkvartilne razlike (IQR) u krvi krava, pod uticajem osam različitih tretmana- nedelju dana posle teljenja

Analizom intenziteta fluorescencije kod neutrofilnih granulocita koji su ispoljili respiratorni prasak, posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum®, nedelju dana posle teljenja, ustanovljena je najmanja prosečna vrednost ovog parametra u tretmanu R2 (241,90±256,50), a najveća u tretmanu T4 (472,40±244,90). Analizom statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti ovog parametra nisu ustanovljene signifikantne

razlike u odnosu na primenjivane tretmane ispitivanja ($p > 0,05$). Najveći koeficijent varijacije je zapažen u tretmanu R2 (75,58%), a najmanji u tretmanu A4 (16,87%).

Na osnovu rezultata neparametrijskog testa rangova (Tabela 5.5.5.3.) ustanovljena je signifikantna razlika ($p < 0,05$) između prosečnog intenziteta fluorescencije tokom respiratornog praska neutrofilnih granulocita merenog Phagoburst[®] testom, u tretmanima A5, A4 i T4, sedam dana pre i sedam dana posle teljenja, kao i između M1 tretmana sedam dana pre i sedam dana posle teljenja. Između vrednosti registrovanih u ostalim tretmanima nisu ustanovljene signifikantne razlike ($p > 0,05$).

Tabela 5.5.5.3. Rang test za intenzitet fluorescencije neutrofilnih granulocita tokom respiratornog praska

Tretmani pre i posle teljenja	Sredine rangova 1	Sredine rangova 2	Razlika sredine rangova
BT- sa BT+	50,83	79,83	-29,00
R2- sa R2+	13,17	60,00	-46,83
R3- sa R3+	14,83	63,83	-49,00
M1- sa M1+	30,50	82,33	-51,83 ^a
M2- sa M2+	28,17	72,50	-44,33
T3- sa T3+	36,83	85,83	-49,00
T4- sa T4+	34,33	92,42	-58,08 ^a
A4- sa A4+	30,33	87,58	-57,25 ^a
A5- sa A5+	32,17	85,50	-53,33 ^a

R2 - 0,05% Rtanjski čaj; **R3** - 0,025% Rtanjski čaj; **M1** - 0,1% menta; **M2** - 0,05% menta; **T3** - 0,025% timijan; **T4** - 0,0125% timijan, **A4** - Armenicum[®] 1:800; **A5** - Armenicum[®] 1:1600; **BT**- bez tretmana; ista mala slova a, ukazuju na signifikantnu razliku, $p < 0,05$.

5.5.6. Rezultati određivanja indeksa respiratornog praska neutrofilnih granulocita posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum[®] nedelju dana pre i nedelju dana posle teljenja

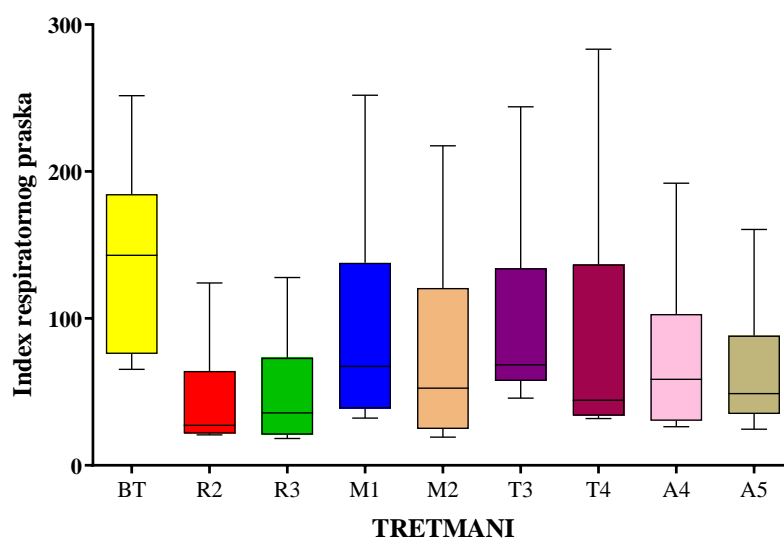
U tabeli 5.5.6.1. su izneti deskriptivni statistički parametri za indeks respiratornog praska neutrofilnih granulocita izračunati nakon dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum[®] punoj krvi mlečnih krava u nedelji pre teljenja.

Tabela 5.5.6.1. Indeks respiratornog praska neutrofilnih granulocita posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum® nedelju dana pre teljenja

	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
BT	6	142,90	108,78	27,22	47,36	251,60	65,32
R2	6	27,25	42,43	16,38	90,49	124,20	20,81
R3	6	35,78	52,27	16,98	84,74	127,90	18,22
M1	6	67,33	99,14	33,86	88,87	252,00	32,24
M2	6	52,55	96,10	30,60	98,42	217,60	19,14
T3	6	68,46	76,74	30,14	75,63	244,10	45,74
T4	6	44,38	102,65	39,98	111,64	283,30	31,93
A4	6	58,53	72,75	25,02	83,47	192,00	26,34
A5	6	48,89	53,44	20,04	76,40	160,60	24,55

R2 - 0,05% Rtanjski čaj; **R3** - 0,025% Rtanjski čaj; **M1** - 0,1% menta; **M2** - 0,05% menta; **T3** - 0,025% timijan; **T4** - 0,0125% timijan, **A4** - Armenicum® 1:800; **A5** - Armenicum® 1:1600; **BT**- bez tretmana.

Dobijeni rezultati su prikazani i grafički.



Grafikon 5.5.6.1a. Srednje vrednosti indeksa respiratornog praska kod neutrofilnih granulocita i interkvartilne razlike (IQR) u krvi krava, pod uticajem osam različitih tretmana nedelju dana pre teljenja

Indeks respiratornog praska kod neutrofilnih granulocita posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum® nedelju dana pre teljenja je bio najmanji u tretmanu R2 (27,25±42,43), a najveći u uzorcima bez tretmana (142,90±108,78). Analizom statističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima ovog parametra nisu ustanovljene signifikantne razlike u odnosu na primenjene tretmane ispitivanja ($p > 0,05$). Variranje vrednosti ovog parametra je bilo veliko, tako da je najveći koeficijent varijacije uočen u tretmanu T4 (111,64%), a najmanji u uzorcima bez tretmana (47,36%).

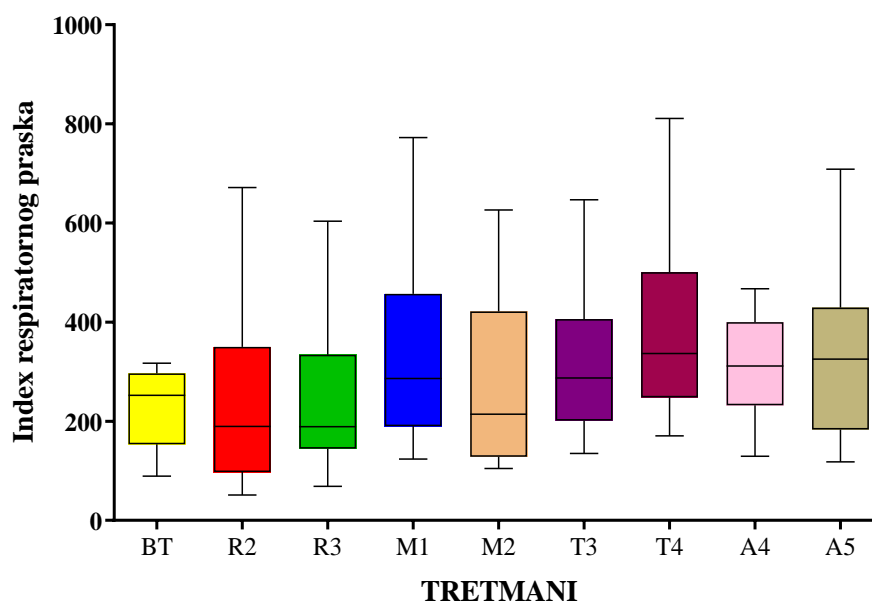
Deskriptivni statistički parametri za indeks respiratornog praska neutrofilnih granulocita izračunati nakon dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum[®] punoj krvi mlečnih krava u nedelji posle teljenja prikazani su u tabeli 5.5.6.2.

Tabela 5.5.6.2. Indeks respiratornog praska neutrofilnih granulocita posle dodavanja različitih biljnih ekstrakta i preparata Armenicum[®] nedelju dana nakon teljenja

Tretmani	n	Me	IQR	Sy	CV (%)	X max	X min
BT	6	252,20	142,70	34,60	36,97	316,90	89,39
R2	6	189,40	252,56	90,26	90,98	671,80	51,15
R3	6	188,80	189,40	75,80	76,08	603,80	68,79
M1	6	286,40	266,80	93,37	67,49	772,60	123,80
M2	6	214,30	293,30	80,14	71,41	626,50	104,80
T3	6	287,50	204,60	71,71	55,30	646,80	134,80
T4	6	336,50	252,30	91,29	57,68	811,20	170,40
A4	6	311,40	167,80	46,09	36,36	467,20	129,60
A5	6	325,40	246,00	82,41	59,99	708,40	117,90

R2 - 0,05% Rtanjski čaj; R3 - 0,025% Rtanjski čaj; M1 - 0,1% menta; M2 - 0,05% menta; T3 - 0,025% timijan; T4 - 0,0125% timijan, A4 - Armenicum[®] 1:800; A5 - Armenicum[®] 1:1600; BT- bez tretmana.

Radi bolje preglednosti, rezultati merenja su prikazani i grafički.



Grafikon 5.5.6.2a. Srednje vrednosti indeksa respiratornog praska kod neutrofilnih granulocita i interkvartilne razlike (IQR) u krvi krava, pod uticajem osam različitih tretmana nedelju dana posle teljenja

Najmanji prosečan indeks respiratornog praska neutrofilnih granulocita je zabeležen u tretmanu R3 (188,80±189,40), a najveći u tretmanu T4 (336,50±252,30). Analizom statističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima ovog parametra nisu ustanovljene signifikantne razlike u odnosu na primenjene tretmane ($p > 0,05$). Variranje vrednosti ovog parametra je bilo veliko, tako da je najveći koeficijent varijacije zapažen u tretmanu R2

(90,98%), a najmanji u tretmanu A4 (36,36%). Na osnovu rezultata neparametrijskog testa rangova (Tabela 5.5.6.3.) ustanovljena je signifikantna razlika ($p < 0,05$) između prosečnih vrednosti indeksa respiratornog praska u tretmanima A5, A4 i T4 sedam dana pre i sedam dana posle teljenja. Između ostalih tretmana nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$).

Tabela 5.5.6.3. Rang test za indeks respiratornog praska neutrofilnih granulocita

Tretmani pre i posle teljenja	Sredine rangova 1	Sredine rangova 2	Razlika sredine rangova
BT- sa BT+	53,17	72,83	-19,67
R2- sa R2+	16,67	63,67	-47,00
R3- sa R3+	19,67	67,00	-47,33
M1- sa M1+	36,33	81,33	-45,00
M2- sa M2+	28,67	73,17	-44,50
T3- sa T3+	40,17	81,67	-41,50
T4- sa T4+	33,00	89,17	-56,17 ^a
A4- sa A4+	30,17	84,33	-54,17 ^a
A5- sa A5+	27,33	82,67	-55,33 ^a

R2 - 0,05% Rtanjski čaj; **R3** - 0,025% Rtanjski čaj; **M1** - 0,1% menta; **M2** - 0,05% menta; **T3** - 0,025% timijan; **T4** - 0,0125% timijan, **A4** - Armenicum® 1:800; **A5** - Armenicum® 1:1600; **BT**- bez tretmana; isto malo slovo a, ukazuju na signifikantnu razliku, $p < 0,05$.

6. DISKUSIJA

U okviru ovog poglavlja razmotreni su rezultati dobijeni određivanjem metaboličkog, hematološkog profila i funkcionalne sposobnosti neutrofilnih granulocita iz pune krvi krava u peripartalnom periodu i to tri nedelje pre i četiri nedelje posle teljenja (termini od I do VII), kao i rezultati uticaja egzogenih faktora na funkcionalnu sposobnost neutrofilnih granulocita iz pune krvi krava u nedelji pre i nedelji posle teljenja. Svi dobijeni rezultati su zatim upoređeni sa rezultatima drugih autora koji su se bavili ovom problematikom.

6.1. Vrednosti metaboličkih parametara mlečnih krava

6.1-3. Koncentracija ukupnih proteina, albumina i globulina u krvnom serumu

Koncentracija ukupnih proteina, albumina i globulina je tokom celog perioda ispitivanja bila stabilna i kretala se u fiziološkim okvirima. Održavanje stabilne koncentracije albumina u krvi ukazuje na očuvanu funkcionalnu sposobnost jetre u dužem periodu.

Pojačana aktivacija jetre i sinteza pozitivnih proteina akutne faze, narušava njene ostale funkcije, zbog toga što dolazi do smanjene sinteze ostalih proteina, verovatno zbog kompeticije za supstrat (Trevisi i sar., 2017; Zhou i sar., 2016). Poremećaj funkcije jetre odnosi se na smanjenje sinteze negativnih proteina akutne faze, pre svega albumina koji imaju ključnu ulogu u održavanju metaboličkog integriteta organizma. Varijacije u njihovoj koncentraciji, naročito tokom tranzicionog perioda, odraz su poremećene homeostaze usled delovanja različitih agenasa na urođeni imunski sistem, što dalje može dovesti do nastanka bolesti (Trevisi i sar., 2017). Pad koncentracije albumina je karakterističan nalaz tokom postojanja zapaljenjskih procesa u organizmu. Nakon teljenja, kada je koncentracija albumina značajno smanjena, mogu se manifestovati brojni zdravstveni problemi, smanjen je unos i iskorišćavanje hranljivih materija i povećana je mobilizacija telesnih rezervi (Bertoni i sar., 2008; Bionaz i sar., 2007; Trevisi i sar., 2012; Trevisi i sar., 2014).

Kod krava koje su se tek otelile, niske vrednosti albumina mogu da imaju za posledicu neadekvatan odgovor na antigene i da povećaju verovatnoću za nastanak endometritisa, mastitisa i drugih bolesti (Nazhat i sar., 2018). Ovi autori su kod krava sa endometritisom

uočili niske vrednosti albumina i prema njihovim navodima one mogu poslužiti kao marker za endometritis.

Analizirajući parametre dobijene određivanjem koncentracije ukupnih proteina i albumina u serumu, uočena su blaga variranja u prva 4 termina, ali u okviru fizioloških granica. Dve nedelje nakon teljenja, došlo je do manjeg pada u koncentracije ukupnih proteina i albumina (Tabele 5.1.1. i 5.1.2.). Kod koncentracije ukupnih proteina se uočava neznatan pad ispod donje fiziološke granice ($69,87 \pm 6,89$ g/l), dok su kod albumina vrednosti bile na donjoj fiziološkoj granici ($27,54 \pm 5,01$ g/l). Ovakav blagi pad koncentracije je u skladu sa fiziološkim stanjem organizma i koncentracije ukupnih proteina i albumina u serumu su uglavnom niže kod krava koje su se tek otelile, zbog toga što se aminokiseline tada koriste za proizvodnju mleka (Puppel i Kuczynska, 2016). Koncentracija ukupnih proteina i albumina je nakon toga ispoljavala tendenciju rasta do završetka studije, takođe u okvirima fizioloških vrednosti.

Tokom naših ispitivanja koncentracija ukupnih proteina i albumina se menjala sinhrono, a slične promene su uočene i za koncentraciju globulina (Tabela 5.1.3.). Naši rezultati su u skladu sa rezultatima istraživanjima koje su sproveli Piccione i sar. (2012). Ovi autori navode da je tokom 5. nedelje nakon teljenja i na kraju laktacije, ukupni sadržaj proteina u krvi bio veći, u poređenju sa kasnom gestacijom i početkom laktacije. Smatra se da ove razlike mogu biti odraz različitih zahteva organizma krave u proteinima za proizvodnju mleka i sintezu kolostralnih imunoglobulina (Mohri i sar., 2007; Roubies i sar., 2006; Bell i sar., 2000).

6.1.4. Koncentracija uree u krvnom serumu

Urea pripada neproteinskim azotnim materijama u krvi i urinu. Neproteinska azotna jedinjenja se ne mogu u potpunosti izlučiti urinom i zbog toga se nakupljaju u krvi. Urea je bitan izvor azota za sintezu proteina. Svaki obrok preživara se sastoji iz proteinskog i neproteinskog dela obroka. Neproteinska azotna jedinjenja iz obroka se razlažu do amonijaka u rumenu i zatim se sintetišu mikrobijalni proteini. Zajedno sa proteinskim delom, koji u nerazgradivom obliku dospeva do rumena, mikrobijalni proteini se razlažu do aminokiselina, koje se dalje resorbuju. Preživari uzimaju znatno više neproteinskog azota u obroku nego

druge vrste životinja. Resorpcija azotnih jedinjenja u digestivnom traktu, naročito kod preživara, utiče na koncentraciju uree u krvi.

Koliko ishrana utiče na koncentraciju uree pokazuju i istraživanja Graugnarda i sar. (2012). Pri ishrani energetski bogatijim hranivom (150% u odnosu na stvarne zahteve muznih krava u tom periodu), koncentracija uree je bila niža pre partusa nego kod kontrolne grupe krava. Bez obzira na činjenicu da su krave resorbovale veće količine amino kiselina, niža vrednost uree je objašnjena većom upotrebom i iskorišćavanjem aminokiselina od strane skeletnih mišića. Tokom laktacije, mlečna žlezda koristi velike količine aminokiselina koje ulaze u sastav proteina mleka. Kasni graviditet i početak laktacije prati smanjen apetit i dolazi do promena u iskorišćavanju uree u rumenu, što još više utiče na smanjenje njene resorpcije i smanjuje se koncentracija uree u serumu tokom postpartalnog perioda (Quiroz-Rocha i sar., 2009).

Pojedini autori dovode u vezu prvu liniju odbrane organizma sa koncentracijom uree u serumu (Kaufmann i sar., 2010; Senosy i sar., 2012; Nazhat i sar., 2018). Ovi autori su ustanovili niže vrednosti uree u krvi krava nakon teljenja i povišen procenat polimorfonuklearnih ćelija u uterusu. Niže vrednosti uree u prvim nedeljama nakon teljenja predstavljaju predisponirajuće faktore za razvoj endometritisa tokom pete i šeste nedelje nakon teljenja. Na povećani rizik od metritisa ukazuju i povećane koncentracije BHB u serumu u prvih 2 nedelja postpartuma, kao i promene u koncentracijama albumina, uree i ukupnog holesterola (Nazhat i sar., 2018). U našem ispitivanju, funkcije jetre nisu bile značajnije narušene, pa ni uticaj na prvu liniju odbrane nije bio izražen.

Naši rezultati su u skladu sa ovim navodima i uočen je pad koncentracije uree u prvoj i drugoj nedelji postpartalno (IV i V termin), sa najmanjom prosečnom koncentracijom u trećoj nedelji ($3,32 \pm 2,14$ mmol/l) (V termin). Najviša prosečna koncentracija je registrovana u šestoj nedelji nakon teljenja - VII termin ($4,56 \pm 2,78$ mmol/l). Statističkom analizom vrednosti za ovaj parametar nisu ustanovljene signifikantne razlike u odnosu na termine ispitivanja ($p > 0,05$), a varijacije u koncentracijama su bile u okviru fizioloških granica (tabela 5.1.5. i grafikon 5.1.5a.). Piccione i sar. (2012) su ustanovili statistički značajnije povećanje koncentracije uree tokom laktacije, u odnosu na vrednosti u periodu kasne gestacije i ovo povećanje dovode u vezu sa ishranom i unosom proteina. Da li će koncentracija uree u serumu rasti ili opadati, zavisi od sadržaja proteina u hranivu, kao i od stepena mobilizacije iz tkiva (Laven i sar., 2007). Niske vrednosti uree ukazuju na nedovoljno izbalansiranu ishranu u

pogledu unosa proteina. U obroku je potrebno izbalansirati različite vrste ugljenih hidrata i proteina i uskladiti brzinu njihove razgradnje u buragu, radi postizanja maksimalne sinteze mikrobijalnih proteina.

6.1.5. Koncentracija neesterifikovanih masnih kiselina

Tokom poslednje dve nedelje gestacije, dolazi do smanjenog unosa hrane usled značajnog pada koncentracije progesterona, povećanja koncentracije estradiola i rasta samog ploda. Sve ovo doprinosi negativnom energetsom bilansu koji se pogoršava sa početkom laktacije. U tom periodu, organizam aktivira adaptacione mehanizme kako bi podržao laktaciju i obezbedio dovoljnu količinu energije potrebne za produkciju mleka. Uz hormonske promene koje karakterišu partus i početak laktacije (nagli pad koncentracije progesterona, veliki porast koncentracije prolaktina i povećana koncentracija hormona rasta), favorizuje se lipoliza (Contreras i sar., 2017), koja postaje dominantan energetski proces. Jedan od homeoretskih mehanizama je smanjenje koncentracije insulina i dolazi do prevage lipolize nad lipogenezom što ima za posledicu porast koncentracije NEMK u krvi iznad gornje fiziološke granice. Stanje dodatno pogoršavaju stres usled teljenja i mogući negativni uticaji okoline (toplotni stres, infekcije, stres usled pregrupisavanja goveda itd.). Homeostaza organizma je narušena i nastaje smanjenje sposobnosti mlečnih grla da se bore protiv bolesti. Odgovor na stres je najčešće smanjeni unos hrane i razvoj zapaljenja uz aktiviranje hipotalamo-hipofizno-adrenalne (HHA) ose i promena u lučenju pojedinih hormona. Nekoliko dana pre i na sam dan partusa, javlja se povećana koncentracije kortizola u krvi, što se smatra posledicom stresa u tom periodu, odnosno prilagođavanja neuro-endokrinog sistema krava nastupajućoj visokoj proizvodnji mleka. Kao posledica visoke koncentracije adrenokortikoidnog hormona, odnosno kortizola u krvi nastaje hiperlipidemija, hiperholesterolemija i povećanje koncentracija slobodnih masnih kiselina u krvi. Osim toga, glukokortikosteroidi smanjuju ulazak i iskorišćavanje glukoze u masnom tkivu i tako smanjuju stvaranje glicerola što rezultira mobilizacijom masnih kiselina iz masnog tkiva i povećanjem njihove koncentracije u krvi.

Osnovni pokazatelji negativnog energetskeg bilansa, koji se javlja u tranzicionom periodu, su koncentracija NEMK i BHB (McCarthy i sar., 2015) i njihove povećane vrednosti su posledica adaptacije organizma krave na NEB. Negativni energetski bilans dostiže

maksimum tokom 2–3 nedelje postpartalno i vraća se na pozitivnu nulu za 8–10 nedelja (Thatcher i sar., 2010).

Povećanje koncentracije NEMK u krvnoj plazmi tokom rane laktacije može imati pozitivan efekat, jer ih životinje koriste za maksimalno povećanje sinteze mleka uz nižu potrošnju glukoze (Piccione i sar., 2012). Međutim, ovaj višak NEMK u krvi dovodi do njihovog nagomilavanja u jetri, gde kao rezultat metaboličke neravnoteže i zbog ograničenog kapaciteta jetre za oksidaciju masnih kiselina, dolazi do nakupljanja triglicerida u hepatocitima i pojave masne jetre (Nikolić i sar., 2003; Van Knegsel i sar., 2007). Ovakva opterećenost jetre dovodi do poremećaja njene funkcije, prvenstveno produkcije enzima, koji su ključni za rad štitne žlezde, iskorišćavanje proteina i sagorevanje masti. Takođe se povećavaju i koncentracije BHB, acetona i aceto-sirćetne kiseline, koji predstavljaju intermedijarne produkte nepotpune oksidacije NEMK do acetil-CoA. Rezultati za koncentraciju NEMK u krvi mlečnih krava, dobijeni u našem istraživanju su u skladu sa rezultatima ostalih autora (Hammon i sar., 2006; Thatcher i sar., 2010; Hayirli i sar., 2011; Piccione i sar., 2012; Fiore i sar., 2017). U prvih 7 dana od teljenja uočava se najviša koncentracija NEMK ($1,05 \pm 0,50$ mmol/l), a zatim se registruje pad sve do šeste nedelje nakon teljenja, sa najmanjom prosečnom koncentracijom od $0,14 \pm 0,17$ mmol/l. Piccione i sar. (2012) su takođe uočili pad od prve nedelje nakon teljenja i sve do pete nedelje laktacije ($0,2 \pm 0,06$ mmol/l). U našim ispitivanjima je koncentracija NEMK u šestoj nedelji nakon teljenja bila signifikantno manja ($p < 0,01$) u odnosu na koncentraciju u nedelji pre teljenja, kao i u odnosu na koncentracije u terminima posle teljenja. Značajne razlike ($p < 0,01$) su ustanovljene između prepartalnih koncentracija u odnosu na koncentracije prve dve nedelje nakon teljenja (tabela 5.1.5. i grafikon 5.1.5a.).

6.1.6. Koncentracija β -hidroksi-butirata u krvnom serumu

Usled smanjenog unosa hrane u ranoj laktaciji, koncentracije NEMK i BHB se povećavaju kao rezultat intenzivne mobilizacije masnog tkiva, lipolize i oksidacije masnih kiselina (Bauman i Currie, 1980; Wathes 2012). Zapaljenski procesi sa ili bez kliničkih manifestacija (supklinički), u kasnom graviditetu utiču na intenziviranje ketoze odmah nakon teljenja (Bertoni i sar., 2008, Trevisi i sar., 2017). Koliko će NEB biti izražen zavisi od režima ishrane, ali i od porasta koncentracije BHB nakon teljenja. Hayirli i sar. (2011) su utvrdili da

je sa približavanjem partusa porast koncentracije BHB bio veći kod krava koje su bile na *ad libitum* režimu ishrane, nego kod onih koje su bile na ograničenom režimu (30%). Međutim, nakon partusa, kod oba tipa ishrane, sa odmicanjem laktacije, tendencija opadanja koncentracije BHB do normalnih fizioloških vrednosti je bila slična.

Promena koncentracije BHB ima istu tendenciju kao i promene koncentracije NEMK. U našim ispitivanjima je najviša prosečna vrednost registrovana u nedelji nakon teljenja ($0,74 \pm 0,43$ mmol/l), a najmanja u šestoj nedelji nakon teljenja (VII termin). Prosečna koncentracija u nedelji nakon teljenja je bila signifikantno veća ($p < 0,01$) u odnosu na prosečne koncentracije pre teljenja (tabela 5.1.6. i grafikon 5.1.6a). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora (Fiore i sar., 2017; Quiroz - Rocha i sar., 2009). Quiroz - Rocha i sar. (2009) su, pored statistički značajnih odstupanja srednjih vrednosti za BHB, pre i posle partusa, uočili statistički značajna odstupanja u ovom periodu i za masne kiseline, glukozu, holesterol, ureu, kalcijum i fosfor.

Moretti i sar. (2016) su dokazali da kod krava sa umerenim NEB, koje su se normalno otelile i uspešno izbacile posteljicu, homeoretski mehanizmi bolje funkcionišu. U našoj ispitivanoj grupi su koncentracije NEMK i BHB bile u skladu sa rezultatima ovih autora i krave su bile u stanju da održavaju koncentraciju BHB na nižem nivou. Promene u jetri nisu bile značajnije izražene, odnosno bile su u okviru fiziološkog zamašćenja u postpartalnom periodu. Tokom trajanja oglada nisu utvrđeni zdravstveni poremećaji koji se mogu dovesti u vezu sa intenzivnom mobilizacijom masti i stvaranjem ketonskih tela.

6.1.7. Koncentracija bilirubina u krvnom serumu

Kod krava se tokom gladovanja ili u periodu oko teljenja uočava hiperbilirubinemija. Promene u koncentraciji bilirubina su posledica degeneracije ćelija jetre, a patološkim vrednostima se smatraju one ispod $6,84 \mu\text{mol/l}$, kao i vrednosti iznad $8,55 \mu\text{mol/l}$. U istraživanju Prodanovića i sar. (2013), ukupna koncentracija bilirubina se značajno povećavala od perioda zasušenja ($6,31 \pm 0,37$ mmol/l) do puerperijuma ($7,63 \pm 2,52$ mmol/l). Bertoni i sar. (2008) su u prvoj nedelji nakon teljenja, ustanovili izraženu bilirubinemiju ($8,7$ - $10,5 \mu\text{mol/l}$) i niže vrednosti uree u grupi krava sa niskim vrednostima albumina. Povišenje vrednosti ukupnog bilirubina i pojačana aktivnost enzima AST ukazuje na povećanu aktivnost i oštećenje hepatocita usled nakupljanja masti u njima (Horvat i Jovanovic, 1999). Tendencija

porasta koncentracije bilirubina je zapažena i u našim rezultatima i to do teljenja, a zatim opada. Skok vrednosti je uočen u šestoj nedelji oglada kad je utvrđena najveća koncentracija ($4,17 \pm 2,20 \mu\text{mol/l}$). Statističkom analizom ovog parametra su ustanovljene signifikantne razlike u srednjim vrednostima i to: prosečna koncentracija u I terminu je bila signifikantno manja ($p < 0,05$) u odnosu na prosečne koncentracije u IV i VI terminu (tabela 5.1.7. i grafikon 5.1.7a.).

6.1.8. Koncentracija glukoze u krvnom serumu

Tokom tranzicionog perioda, usled partusa i početka laktacije, dolazi do različitih hormonskih promena. Usled prilagođavanja metabolizma ovim intenzivnim promenama, nakon partusa obično dolazi do hipoglikemije (Quiroz-Rocha i sar., 2009). U ranom postpartalnom periodu kod krava se pored mobilizacije masti, povećava i glukoneogeneza u jetri kako bi se obezbedila glukoza za sintezu laktoze mleka. Nizak nivo glukoze se objašnjava činjenicom da mlečna žlezda utroši 50% do 85% od ukupne glukoze u organizmu, tako da veća proizvodnja mleka uslovljava i nižu glikemiju (Bicalho i sar., 2017; Aschenbach i sar., 2010).

Naši rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora (Hayirli i sar., 2011; Quiroz-Rocha i sar., 2009), koji su utvrdili blaga variranja glikemije u okviru fizioloških granica pre teljenja, a zatim pad u prvoj nedelji nakon teljenja. U rezultatima naših istraživanja, najmanja prosečna koncentracija ($2,72 \pm 0,52 \text{ mmol/l}$) registrovana je u prvoj nedelji nakon teljenja i zatim se uočava tendencija blagog porasta (tabela 5.1.8. i grafikon 5.1.8a.). Međutim, statističkom analizom vrednosti ovog parametra nisu ustanovljene signifikantne razlike u odnosu na termine ispitivanja ($p > 0,05$).

6.1.9. Aktivnost aspartat aminotransferaze u krvnom serumu

Uobičajeno je da se funkcija jetre procenjuje i na osnovu aktivnost nekoliko enzima: γ -glutamilttransferaze (GGT), alanin-aminotransferaze (ALT), aspartat-amino-transferaze (AST) i sorbitol dehidrogenaze (SDH).

Uzrok povišenih vrednosti za aktivnost AST mogu biti intenzivni metabolički procesi ili oštećenja hepatocita. Na te vrednosti može uticati visok sadržaj triglicerida, ali i visok sadržaj azota u hranivu (Sakowsky i sar., 2012). Prema navodima Marai i sar. (1997), jedan od razloga mogu biti i visoke ambijetalne temperature. Porast koncentracije AST koji smo utvrdili u prvoj nedelji nakon partusa bio je iznad fizioloških vrednosti i ovako visoke vrednosti zadržale su se i tokom druge i treće nedelje nakon teljenja. Puppel i Kuczynska (2016) su takođe zapazili najviše vrednosti aktivnosti AST tokom rane laktacije koje su sa odmicanjem laktacije opadale. U našim ispitivanjima je uočen pad aktivnosti AST u šestoj nedelji nakon teljenja, kada su vrednosti bile na nivou fizioloških. Statističkom analizom značajnosti razlika u srednjim vrednostima ovog parametra ustanovljena je signifikantno veća aktivnost AST u periodu posle teljenja (tabela 5.1.9. i grafikon 5.1.9a.).

6.1.10. Aktivnost alanin amino-transferaze u krvnom serumu

Analizom vrednosti dobijenih određivanjem aktivnosti ALT, u našem ispitivanju je ustanovljena tendencija smanjivanja do prve nedelje nakon teljenja kada je i zabeležena najniža vrednost ($8,64 \pm 7,18$ U/l). Zatim je uočen porast sa najvećom prosečnom aktivnošću u VII terminu ($25,28 \pm 11,33$ U/l). Smanjenje aktivnosti ALT u sedmom i osmom mesecu gestacije i na početku laktacije uočili su i Radkowska i Herbut (2014). Smanjena aktivnost ALT u ranoj fazi laktacije ukazuje na oštećenje jetre, uglavnom zbog NEB koji nastaje u ovom periodu (Sakowsky i sar., 2012). Sve vrednosti za aktivnost ALT u našem istraživanju su bile u okviru fizioloških granica. Statističkom analizom razlika u srednjim vrednostima ovog parametra ustanovljene su signifikantno veće vrednosti na kraju oglada u odnosu na ostale postpartalne termine. Aktivnost ALT je u prvoj nedelji nakon teljenja bila statistički značajno manja u odnosu na termine pre teljenja (tabela 5.1.10. i grafikon 5.1.10a.).

6.1.11. Koncentracija kalcijuma u krvnom serumu krava

Koncentracija kalcijuma u serumu mlečnih krava se smanjuje na dan samog partusa ili u prvim danima nakon teljenja, kao odgovor na povećane zahteve u Ca^{2+} od strane mlečne žlezde (Piccione i sar., 2012; Quiroz- Rocha i sar., 2009), a zatim se uočava tendencija rasta tokom laktacije. Smanjenje nivoa Ca^{2+} i P u krvi pred, za vreme i nakon teljenja je

najverovatnije posledica smanjene aktivnosti štitne žlezde (Jazbec, 1990). Za sintezu kolostruma pored belančevina i masti, potrebno je i dosta mineralnih materija. Sa prvom mužom kolostruma izluči se prosečno 182 mg/ml Ca^{2+} i 175 mg/100 ml fosfora (Jazbec, 1990). Analizom koncentracije kalcijuma, u našem ispitivanju su ustanovljene statistički značajno veće vrednosti u terminima nakon teljenja i nije uočeno smanjenje koncentracije Ca^{2+} karakteristično za ovaj period (tabela 5.1.11. i grafikon 5.1.11a.). Ovo je verovatno posledica činjenice da je krv uzorkovana 7 dana pred i 7 dana nakon teljenja, a ne neposredno pred ili posle partusa. Prema navodima drugih autora pad u koncentraciji Ca^{2+} se uočava 2-3 dana nakon teljenja kao odraz početka lučenja kolostruma, odnosno mleka (Quiroz-Rocha i sar., 2009). Hernández-Castellano i sar. (2017) su takođe uočili pad koncentracije oko termina teljenja i minimalnu vrednost prvog dana nakon teljenja, dok već od 3. dana nakon teljenja dolazi do normalizacije koncentracije Ca^{2+} u serumu. Nedavno je saopšteno da kod krava, kod kojih su vrednosti Ca^{2+} pre ili posle partusa ispod 2,0 mmol/l, postoji veći rizik za nastanak postpartalnih oboljenja (Van Saun, 2016). Ovo bi moglo indirektno da ukaže na ulogu kalcijuma za funkcije ćelija odbrambenog sistema.

6.1.12. Koncentracija fosfora u krvnom serumu krava

Fiziološku hipokalcemiju (prolazno smanjenje koncentracije Ca^{2+} u serumu sa uobičajenih 2,75 mmol/l na 1,75 mmol/l; Jazbec, 1990) prati i smanjenje sadržaja fosfora, dok se sadržaj Mg u izvesnoj meri povećava. Paratiroidni hormon koji se izlučuje kao odgovor na hipokalcemiju utiče na metabolizam fosfora, tako da nastupa blaga hipofosfatemija. Paratiroidni hormon povećava izlučivanje fosfata preko pljuvačke i u manjoj meri preko bubrega. Staza rumena koja nastupa oko teljenja može “zarobiti” fosfat u buragu, tako da on ne dospeva do creva gde se kasnije može resorbovati i iskoristiti za obnovu fosfora u krvi (Goff, 2006). Pad koncentracije kalcijuma i fosfora u serumu krava tokom rane laktacije ukazuje na njihovo intenzivno iskorišćavanje od strane mlečne žlezde (Krsmanović i sar., 2015). Tokom puerperijuma, nastupa nagli pad koncentracije fosfora u serumu kod krava kada se za svaki litar kolostruma utroši 0,8-1,9 g fosfora. Krsmanović i sar. (2015) su uočili niže vrednosti fosfora u serumu krava nakon teljenja i to značajno niže u odnosu na vrednosti fosfora u kasnijoj laktaciji. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima ovih autora i mi smo takođe uočili blagi pad koncentracije fosfora do teljenja i najmanju prosečnu koncentraciju u prvoj nedelji nakon partusa ($1,66 \pm 0,59$ mmol/l). Zatim se zapaža tendencija rasta, sa

najvećom koncentracijom u šestoj nedelji nakon teljenja ($2,50 \pm 1,09$ mmol/l). Ova vrednost je signifikantno veća ($p < 0,01$) u odnosu na prosečne koncentracije u prvoj nedelji nakon teljenja (tabela 5.1.12 i grafikon 5.1.12a.).

6.1.13. Koncentracija magnezijuma u krvnom serumu krava

Magnezijum je odgovoran za aktivaciju više od 300 enzima i kao kompleks Mg-ATP je neophodan za veliki broj procesa kao što su glikoliza, energetski zavisani membranski transport i formiranje cikličnog AMP-a. Homeostaza magnezijuma zavisi od optimalnog snabdevanja iz alimentarnih izvora, odnosno koncentracija Mg zavisi od resorpcije u rumenu. Magnezijum je važan mineral koji je uključen u homeostazu Ca^{2+} i smanjenje koncentracije magnezijuma može dovesti do nastanka hipokalcemije (Martinez i sar., 2012). Nedostatak magnezijuma u hranivu za muzne krave inhibira sintezu i sekreciju paratireoidnog hormona, smanjuje resorpciju kalcijuma i neorganskog fosfora u digestivnom traktu i inhibira proizvodnju aktivne forme vitamina D (Đoković i sar., 2014). Nizak nivo kalcijuma i magnezijuma kod muznih krava tokom puerperijuma dovodi do smanjene proizvodnje insulina. Ovo rezultira poremećajem metabolizma organskih hranljivih materija i stvaranjem predispozicije za nastanak ketoze i masne jetre. Kod muzne krave sa telesnom masom od 500kg: 0,7 g Mg se nalazi u krvi, 2,5 g u ekstracelularnim tečnostima, 70 g unutar ćelija i 170 g u mineralima kostiju. U jednom litru mleka se nalazi otprilike 5,2 mmol Mg. Kod krava u laktaciji, brzo dolazi do smanjenja koncentracije ekstracelularnog Mg i nastupa hipomagnezijemija ukoliko se Mg ne nadomesti. Za razliku od deficita Ca^{2+} , kod kojeg je moguće nadomestiti deficit resorpcijom iz kostiju, kod deficita Mg to nije moguće. Održavanje normalnih vrednosti Mg u krvnoj plazmi zavisi isključivo od unosa Mg hranivom. Krave koje imaju nisku koncentraciju Mg u serumu (0,5 - 0,8 mmol/l), sporije jedu i dolazi do smanjenja proizvodnje mleka (Goff, 2006).

Đoković i sar. (2014) su ustanovili najniže koncentracije Mg u krvi kod krava tokom puerperijuma, koje se nisu mnogo razlikovale od vrednosti pre teljenja, ali su bile statistički značajno niže ($p < 0,05$) u poređenju sa vrednostima u odmakloj laktaciji. Statistički značajno više koncentracije Mg u kasnoj laktaciji u odnosu na vrednosti u puerpeijumu su ustanovili i Krsmanović i sar. (2015). Pojava hipomagnezijemije ($< 0,83$ mmol/l) u peripartalnom periodu, ukazuje na neadekvatnu ishranu (Goff, 2006).

U našim rezultatima, postoji tendencija rasta od prvog do poslednjeg termina sa značajnim razlikama između prosečnih koncentracija pre i posle teljenja (tabela 5.1.13. i grafikon 5.1.13a.). Za razliku rezultata objavljenih u studijama pojedinih autora (Đoković i sar., 2014; Martinez i sar., 2012), mi nismo zapazili pad koncentracije Mg nakon partusa. Sa odmicanjem laktacije, u našim ispitivanjima su ustanovljene povišene vrednosti Mg, što je u skladu sa rezultatima Krsmanovića i sar. (2015).

Koncentracije Ca, P i Mg u krvnom serumu su tokom oglada bile u fiziološkim okvirima, a istovremeno nije bilo zdravstvenih poremećaja u čijoj osnovi leži poremećaj metabolizma ispitivanih minerala. Statistički značajne razlike u srednjim vrednostima koje su utvrđene među pojedinim terminima uzorkovanja ukazuju na aktivne homeostatske mehanizme.

6.2. Vrednosti hematoloških parametara mlečnih krava

Smatra se da je određivanje vrednosti određenih hematoloških parametara kao indikatora fiziološkog, nutritivnog, metaboličkog i kliničkog statusa domaćih životinja od velikog značaja. Pored vrednosti parametara biohemijskog sastava krvi one omogućavaju potpuniji uvid u zdravstveno stanje jedinke. Poznavanje hematoloških vrednosti je od nesumnjive koristi u dijagnostici različitih patoloških i metaboličkih poremećaja, karakterističnih za tranzicioni period. Stres, kao i negativni energetske bilans koji prati tranzicioni period mogu značajno uticati na vrednosti pojedinih hematoloških parametara.

Posmatrajući dinamiku promena u vrednostima hematoloških parametara ustanovljeno je da, izuzimajući pad procenta monocita ispod fizioloških vrednosti karakterističnih za goveda, ostali parametri variraju, ali u okviru fizioloških vrednosti. U nedelji posle teljenja uočavaju se promene u vrednostima svih hematoloških parametara.

a) Hematološki parametri bele krvne loze

Radi sticanja potpunijeg uvida u zdravstveno stanje plotkinja, vrednosti parametara bele krvne slike prikazani su i diskutovani zajedno u okviru ovog podpoglavlja.

Posmatrajući ove parametre, uočava se pad u broju leukocita, procentu monocita i neutrofilnih granulocita, dok se vrednosti za procenat limfocita povećavaju u prvoj nedelji nakon teljenja. Kod svih ovih parametara, u šestoj nedelji nakon teljenja, vrednosti se vraćaju na one koje su bliske vrednostima u trećoj nedelji pre teljenja. Neutropenija koja se ovde uočava može biti odraz akutne stresne situacije (teljenje), što je u skladu sa navodima Tornkuist-a i Rigas-a (2010). Stres u periodu oko teljenja pored neutropenije karakteriše i limfopenija, ali u našim ispitivanjima ona nije uočena. Quiros-Rocha i sar. (2009) u svojim istraživanjima nisu zapazili neutropeniju, niti limfopeniju. Statistički značajno manje vrednosti ukupnog broja leukocita, kao i neutrofilnih granulocita posle teljenja uočili su Orrù i sar. (2012) i Quiros-Rocha i sar. (2009). Naime, Orrù i sar. (2012) su uočili povećanje ukupnog broja leukocita, neutrofilnih granulocita i monocita, tokom približavanja termina partusa. Najviše vrednosti su registrovane u vreme teljenja, ali je zatim usledio pad tokom druge i treće nedelje nakon teljenja.

Naši rezultati takođe ukazuju na tendenciju pada u učešću neutrofilnih granulocita u beloј krvnoj lozi tokom druge i treće nedelje nakon teljenja (tabela 5.2.6.). Mi smo uočili i pad procenta monocita u beloј krvnoj lozi ispod fizioloških vrednosti i tek na kraju oglada blagi porast do vrednosti bliskoj onoj u prvom terminu ispitivanja (tabela 5.2.5.). Pad ukupnog broja leukocita i neutrofilnih granulocita nakon teljenja i blagi porast limfocita, uočili su i Gävan i sar. (2010). U njihovom istraživanju, broj leukocita raste u periodu srednje laktacije i autori ovu pojavu objašnjavaju mogućnošću postojanja hroničnih infekcija. Kako se u našem istraživanju broj ukupnih leukocita smanjivao sve do šeste nedelje nakon teljenja, kada dostiže i svoj minimum, može da se zaključi da u ispitivanoj grupi nije bilo hroničnih infekcija (tabele 5.2.1.). Morreti i sar. (2016) su takođe uočili povećanje broja leukocita i neutrofilnih granulocita i smanjenje broja eozinofilnih granulocita kod krava koje na vreme izbace posteljicu, što su protumačili normalnim odgovorom na zapaljenske i stresne stimulanse neophodne za pravilan tok partusa.

b) Hematološki parametri crvene krvne loze

Vrednosti parametara crvene krvne slike, uključujući i izvedene parametra, prikazani su i diskutovani zajedno u okviru ovog podpoglavlja.

Posmatrajući eritroidnu lozu, u nedeljama nakon teljenja, dolazi do tendencije pada u broju eritrocita (tabela 5.2.7.), pada u vrednostima Hb, MCH i MCHC (tabele 5.2.8., 5.2.11., 5.2.12.). Niže vrednosti eritrocita i hemoglobina posle teljenja su u skladu sa rezultatima drugih autora (Gavan i sar., 2010; Orrù i sar., 2012) što oni objašnjavaju mogućim deficitom gvožđa. Posmatrajući vrednosti za parametre Hct i MCV, uočava se blagi porast u prvoj nedelji nakon teljenja. Vrednosti Hct i MCV se zatim smanjuju do VII termina, kada su vrednosti i statistički značajno manje u odnosu na vrednosti pred teljenje i u prvoj nedelji nakon teljenja. Vrednosti za MCH i MCHC, uz oscilacije tokom postpartalnog perioda, na kraju oglada dostižu vrednosti koje su statistički značajno veće od vrednosti registrovanih u I terminu. Za razliku od blagog povećanja MCV, koje je uočeno u našem istraživanju, Gavan i sar. (2010) su uočili smanjenje MCV vrednosti u nedelji nakon teljenja. Posmatrajući grupu krava sa zaostalom posteljicom i kontrolnu grupu krava, Moretti i sar. (2016) su uočili povećanje broja eritrocita, koncentracije hemoglobina i hematokritske vrednosti prilikom teljenja i to objasnili uticajem stresa i umerene dehidracije, koja se javlja prilikom porođaja (Bell, 1995). Međutim, variranja ovih vrednosti su bila u okviru fizioloških granica, kao i u našem istraživanju.

Kod jedinki, uključenih u naša ispitivanja, dobijeni rezultati ukazuju da funkcija hematopoetskih ćelija nije bila značajno izmenjena pod uticajem endogenih faktora. Pojedini autori ističu hiperketonemiju kao moguć uzrok leukocitne disfunkcije kod preživara. Ipak, za indukovanje ovog efekta potrebne su vrlo velike koncentracije acetonskih tela u krvi (Sartorelli i sar., 1999; Scalia i sar., 2006), što u našim ispitivanjima nije utvrđeno. Vrednosti utvrđene za nivo BHB nakon teljenja su bile daleko niže od onih potrebnih da dovedu do intenzivne inhibicije proliferacije hematopoetskih ćelija u kostnoj srži (Hoeben i sar., 1999). Kod većine parametara, posebno bele krvne slike, nisu uočene statistički značajne razlike između srednjih vrednosti registrovanih u pojedinim terminima ispitivanja. Razlike u vrednostima koje se javljaju pre i posle teljenja su u skladu sa saznanjima drugih autora (Gavan i sar., 2010; Orrù i sar., 2012; Morreti i sar., 2016) i ukazuju da dobijene vrednosti

hematoloških parametara predstavljaju odraz normalnog fiziološkog odgovora na zapaljenske i stresne stimulacije oko partusa.

6.3. Pokazatelji funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita

U tranzicionom periodu, kod krava dolazi do intenzivnih metaboličkih i hormonskih promena i izmena u funkcijama ćelija imunskog sistema (i urođenog i stečenog). Veći broj autora je proučavao tranzicioni period pokušavajući da objasni i utvrdi korelaciju između metaboličkih promena koji prate ovaj period sa imunosupresijom koja se takođe javlja u tom periodu (Ingvarstsen i Moyes, 2015; Madsen i sar., 2002; Sordillo i sar., 2009). U literaturi su iznete različite hipoteze o uticaju promena tokom tranzicionog perioda na funkcije neutrofilnih granulocita kao prve linije odbrane organizma. Poremećaj njihove funkcije podrazumeva oslabljenu hemotaksu i sporiju migraciju neutrofilnih granulocita do mesta infekcije (Kehrli i sar., 1989; Sartorelli i sar., 1999; Sartorelli i sar., 2000; Zerbe i sar., 2000). Pojedini autori navode i poremećaje fagocitoze i respiratornog praska (Gilbert i sar., 1993; Zerbe i sar., 1993; Kimura i sar., 2002; Ingvertsen i Moyes, 2015). Prema navodima brojnih autora, kod zdravih krava funkcije neutrofilnih granulocita postepeno slabe, kako se teljenje približava i oslabljene funkcije neutrofilnih granulocita su najizraženije ubrzo nakon teljenja. Zatim se na tom nivou zadržavaju tokom prve dve nedelje nakon teljenja i onda se postepeno intenziviraju ka šestoj nedelji postpartalno (Gilbert i sar., 1993; Moya i sar., 2008; Milovanović, 2014).

U okviru ovog podpoglavlja razmotreni su rezultati dobijeni određivanjem funkcionalne sposobnosti neutrofilnih granulocita iz pune krvi analizama uz pomoć protočne citometrije komercijalnim testovima "Phagotest" i "Phagoburst", kao i ELISA testom kada je određivana aktivnost mijeloperoksidaze. Rezultati su upoređeni sa istraživanjima drugih autora i tumačeni u odnosu na klinička i laboratorijska zapažanja.

6.3.1. Funkcionalna aktivnost neutrofilnih granulocita, Phagotest[®] - test procene fagocitne sposobnosti neutrofilnih granulocita

U navedenim ispitivanjima je izvršena procena nespecifične odbrambene funkcije neutrofilnih granulocita iz pune krvi u procesu fagocitoze kod svih krava pre i nakon teljenja.

Srednje vrednosti procenta fagocitne aktivnosti neutrofilnih granulocita u punoj krvi krava, u zavisnosti od dana laktacije, statistički su se značajno razlikovale. Procenat aktiviranih ćelija koje su izvršile fagocitozu je bio visok i iznosio je $70,80 \pm 20,93\%$ (tri nedelje pre teljenja), a zatim bio u konstantnom porastu sve šeste nedelje nakon teljenja kada je dostigao vrednost od $89,54 \pm 7,61\%$. Ovaj rezultat ukazuje da je aktivnost neutrofilnih granulocita stabilan proces koji se pojačavao kako je tekao oporavak nakon teljenja (tabela 5.3.1.1 i grafikon 5.3.1.1a.). Udeo neutrofilnih granulocita koji je reagovao fagocitozom u šestoj nedelji nakon teljenja bio je signifikantno veći ($p < 0,01$) u odnosu na prosečne procentualne vrednosti u terminima II, III i u nedelji nakon teljenja (IV).

Uvidom u podatke iz literature može se zaključiti da fagocitoza od strane neutrofilnih granulocita, u odnosu na vreme teljenja, generalno ispoljava dinamične promene u smislu postepenog opadanja ka terminu teljenja, uz blagi pad nakon teljenja i oporavak ka šestoj nedelji, što je odlika zdravih krava i navodi se u studijama drugih autora (Gilbert i sar., 1993; Moya i sar., 2008; McDougall i sar., 2017). Isto tako, ona ostaje konstantna i visoka tokom celokupnog peripartalnog perioda, bez obzira da li se radilo o zdravim kravama (Kehrli i sar., 1989b; Hoedemaker i sar., 1992; Zerbe i sar., 1996, Milovanović, 2014) ili kravama sa puerperalnim metritisom (Cai i sar., 1994). Nisu takođe utvrđene statistički značajne razlike u procentualnoj fagocitnoj aktivnosti niti u intenzitetu fagocitoze od strane neutrofilnih granulocita pune krvi između krava razvrstanih prema kasnijem reproduktivnom statusu (Milovanović, 2014).

Međutim, u ispitivanju Graugnard-a i sar. (2012), dobijeni su slični rezultati kao u našoj studiji i to u oglednoj grupi krava na pojačanoj ishrani u periodu zasušenja. Naime, ovi autori su ispitivali uticaj dva pristupa ishrani krava u zasušenju (obrok koji zadovoljava preporučene energetske potrebe krava u prepartalnom periodu ili prelazi preporučene energetske potrebe, što je obezbeđeno pojačanom ishranom). U oglednoj grupi je registrovano intenziviranje fagocitoze u peripartalnom periodu, bez obzira na termin teljenja, što nije bio slučaj u kontrolnoj grupi držanoj na standardnom obroku za zasušene krave (1,62 Mcal/kg

suve materije prema 1,34 Mcal/kg suve materije). Autori su ovaj fenomen objasnili visokim koncentracijama glukoze u krvi krava sa obilnijom ishranom i prema njihovom mišljenju, glukoza je "poželjno metaboličko gorivo" za ćelije odbrambenog sistema, pre nego što su to masne kiseline ili ketonska tela (Pithon-Curi i sar., 2004). U našem ogledu, kod krava su registrovane visoke vrednost glukoze kako pre teljenja, tako i posle teljenja (od $2,72 \pm 0,52$ mmol/l do $3,08 \pm 0,42$ mmol/l), i krave su uspešno održavale glikemiju u okviru visokih i stabilnih fizioloških vrednosti. Takođe je, u našoj studiji, koncentracija poznatih "inhibitora" odbrambenih reakcija, kao što su BHB i NEFA (Hoeben i sar., 1997; Sartorelli i sar., 1999; Suriyasathaporn i sar., 2000) bila u fiziološkim granicama. Osim toga, tokom tranzicionog perioda, gubitak telesne kondicije je bio minimalan (podaci su izneti u daljem tekstu).

Intenzitet fagocitoze neutrofilnih granulocita, kao i indeks fagocitoze u odnosu na vreme teljenja generalno takođe ispoljavaju dinamične promene u smislu postepenog porasta ka terminu teljenja, uz blagi pad u naredne dve nedelje nakon teljenja. Kasnije dolazi do stabilizacije i postepenog porasta ka šestoj nedelji, sa različitim stepenima statističke značajnosti (tabela 5.3.1.2. i grafikon 5.3.1.2a.).

U našem ispitivanju je utvrđen evidentan trend porasta intenziteta fluorescence (MIF F) sa približavanjem termina teljenja, a zatim je nastupio blaži pad tokom prve tri nedelje nakon teljenja. Porast je ponovo registrovan ka šestoj nedelji nakon teljenja. Usled visokih individualnih varijacija unutar grupa, ustanovljena je samo statistička značajnost razlika između srednjih vrednosti zabeleženih u trećoj nedelji nakon teljenja ($p < 0,05$), u odnosu na prosečan intenzitet fagocitoze u trećoj nedelji pre teljenja. Između ostalih termina posmatranja nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$). Međutim, ove su razlike očiglednije i statistički značajnije ukoliko se analizira vrednost indeksa fagocitoze (proizvod vrednosti procenta i intenziteta fagocitoze) nakon teljenja u okviru posmatranih termina. To ukazuje da se njihov ukupni kapacitet (broj fagocitovanih bakterija i intenzitet fagocitoze) znatno pojačava neposredno nakon teljenja i sa odmicanjem laktacije (tabela 5.3.1.3. i grafikon 5.3.1.3a.). Indeks fagocitoze prati tendenciju promena intenziteta fagocitoze tako da je najmanja prosečna vrednost indeksa zabeležena u trećoj nedelji pre teljenja, a najveća u prvoj nedelji nakon teljenja. Ustanovljene su signifikantno manje vrednosti indeksa fagocitoze ($p < 0,01$) u trećoj nedelji pre teljenja u odnosu na prosečnu vrednost indeksa u svim terminima posle teljenja. Prema tome, uočene su značajno veće ($p < 0,01$) prosečne vrednosti indeksa fagocitoze nakon teljenja u odnosu na vrednosti sa početka ogleada.

Vrednosti registrovane u našoj studiji su u saglasnosti sa većinom nalaza dobijenih u sličnim ispitivanjima. Tako su Kehrl i sar. (1989) ustanovili porast ingestije ^{125}J obeleženih *S. aureus* od druge ka prvoj nedelji pred teljenje, da bi zatim došlo do pada stepena ingestije u prvoj, a naročito u drugoj nedelji nakon teljenja. Značajno povećanje je zabeleženo u nedelji pre teljenja, u odnosu na pad u drugoj nedelji nakon teljenja ($p=0,02$). U odnosu na kontrole, ingestija *S. aureus* od strane neutrofilnih granulocita je bila za 7% veća 3 - 4 nedelje pre teljenja, za 24% veća četvrtog dana pre teljenja, da bi zatim opala za 11% dve nedelje nakon teljenja.

Slične rezultate su dobili Hussain i Daniel (1992) analizirajući procenat aktivnih neutrofilnih granulocita u fagocitozi kvasca *Candida albicans* i broj fagocitovanih ćelija (indikator intenziteta fagocitoze), kao i indeks fagocitoze kod grupe krava sa normalnim tokom teljenja, u odnosu na teljenja indukovana deksametazonom ili završena carskim rezom. Ustanovljene su signifikantne razlike ($p=0,01$) za prosečan broj aktiviranih neutrofilnih granulocita krvi, kako između grupa, tako i prema danima laktacije. Fagocitna aktivnost je kod krava koje nisu imale reproduktivne probleme bila znatno viša nego kod krava u drugoj grupi. Zdrave krave su imale najviši procenat i intenzitet fagocitoze, kao i njihov proizvod (indeks F), drugog, petog i osmog dana nakon teljenja, u poređenju sa grupama "problematičnih" krava. Ovo ukazuje da neutrofilni granulociti krava sa normalnim tokom porođaja imaju visok kapacitet ingestije i uništavanja bakterija neposredno nakon teljenja.

Nasuprot ovim rezultatima, ima radova u kojima se ukazuje na pad parametara fagocitoze u periodu pre i/ili neposredno nakon teljenja, pogotovo kod problematičnih krava (razvoj mastitisa, metritisa i endometritisa, zaostala posteljica, kasniji slabi reproduktivni rezultati). Kim i sar. (2005) su upoređivali fagocitnu sposobnost neutrofilnih granulocita u peripartalnom periodu kod mlečnih holštajn krava kod kojih je nastao endometritis do četvrte nedelje nakon teljenja u odnosu na krave kod kojih nije došlo do razvoja endometritisa. Uzorci krvi su prikupljeni nedelju dana pre teljenja, neposredno nakon teljenja ili u toku teljenja, a zatim svake naredne nedelje (ukupno četiri ciklusa uzorkovanja). Kod krava sa endometritisom, fagocitna sposobnost lateksnih čestica, od strane neutrofilnih granulocita je bila slabija u odnosu na kontrolnu grupu u svim ispitivanim periodima ($p<0,01$). "Kapacitet fagocitoze" je u ovom radu predstavljao procenat aktivnih neutrofilnih granulocita u procesu fagocitoze lateksnih čestica. On se povećavao ka poslednjoj nedelji pred teljenje, ali je zatim opao na početne vrednosti u prvoj nedelji nakon teljenja i zadržao se na ovim vrednostima sve do četvrte nedelje nakon teljenja. Slično ovim rezultatima, Newbould (1976) i Guidry i sar.

(1976) takođe opisuju porast fagocitne sposobnosti i navode da ona dostiže vrhunac dve nedelje pre teljenja (nedelju dana ranije) i da naglo opada neposredno nakon teljenja. Navodi se da smanjena fagocitna aktivnost neutrofilnih granulocita u cirkulaciji tokom prve dve nedelje nakon teljenja može doprineti većoj osetljivosti ka infekcijama.

Sposobnost neutrofilnih granulocita iz sistemske cirkulacije da vrše fagocitozu, tokom ovog vremena bila je takođe smanjena (Daniel i sar., 1987) ili nepromenjena (Berning 1990 - citat iz Paape i sar., 1992; Kehrl i sar., 1989). Paape i sar. (1992) navode da je stepen fagocitoze i oksidativnog praska kod monocita i neutrofilnih granulocita poreklom iz mlečne žlezde u konstantnom opadanju od trenutka zasušenja, kao i da je sâm sekret mlečne žlezde u zasušenju u izvesnoj meri imunosuspresivan.

Kao što je već navedeno, procenat neutrofilnih granulocita krvi koji su vršili fagocitozu je u našim ispitivanjima bio relativno visok (od 70,80 do 89,54%). Ovi rezultati odgovaraju nalazima drugih autora: 73,8-78,8% (Zerbe i sar., 1996), oko 90% (Mateus i sar., 2002) i vrednostima od $82,42 \pm 10,11$ i $87,63 \pm 8,91$ pre i nakon teljenja (Milovanović, 2014). Srednje vrednosti procenta neutrofilnih granulocita krvi koji su izvršili fagocitozu (jedne ili više bakterija), kao i prosečan intenzitet njihove fluorescence (MIF F), u sve tri navedene studije, kao i u našim ispitivanjima nisu bile statistički značajno različite pre i nakon teljenja. Ove vrednosti su bile niže u ispitivanjima Moya i sar. (2008), gde se procenat aktiviranih ćelija u pravcu fagocitoze kod krava sa jednokratnom mužom kreće do 34,1%, a kod onih sa dvokratnom mužom do 54,4%. Varijacije su uočene i u zavisnosti od perioda analize. Bitno je napomenuti da u su u navedenim ispitivanjima korišćene iste metode analize (protočna citometrija) i komponente za analizu istog proizvođača (komercijalni test "Phagotest", Glykotype Biotechnology GmbH, Heidelberg, Nemačka).

Fagocitoza je, od strane neutrofilnih granulocita krvi, bila konstantno visoka i tokom normalnog puerperijuma (Kehrl i sar. 1989, Hoedemaker i sar. 1992 i Zerbe-a i sar. 1998), kao i kod krava sa puerperalnim metritisom (Cai i sar., 1994). Nakon toga, ove vrednosti su rasle i dostizale su maksimalni nivo 26. dana nakon teljenja. Razlika nije uočena ni kod krava koje su bile podeljene na grupu "steonih krava" - krave koje su ostale steone unutar 150 dana laktacije i koje su imale manje od 3 osemenjavanja u navedenom periodu i grupu "problematičnih krava" (uglavnom nesteone), koje su imale više od 3 osemenjavanja i/ili servis period duži od 150 dana (Milovanović, 2014). Ova ispitivanja su vršena kod krava holštajn rase, visokih proizvodnih odlika, sa različitim stepenom reproduktivnih problema u

vidu endometritisa. Nasuprot tome, u ovoj studiji su bile zastupljene krave simentalke rase sa umerenom proizvodnjom, dobrom reprodukcijom i brzom involucijom materice. Kod njih je zabeležen gotovo konstantan porast aktivnosti neutrofilnih granulocita ka teljenju i statistički značajno viša aktivnost u postpartalnom periodu (odgovara periodu involucije materice i visokog rizika od nastanka matitisa). Aktivnost neutrofilnih granulocita prate fiziološke potrebe organizma, pojačavajući aktivnost u kritičnom periodu nakon teljenja. Slične rezultate iznose Kehrl i sar. (1989), koji su analizirali migratornu sposobnost neutrofilnih granulocita, jodinaciju i hemiluminescenciju. Autori su uočili slične obrasce promene fagocitne aktivnosti neutrofilnih granulocita (rast ka teljenju, a zatim postepeni pad).

6.3.2. Funkcionalna aktivnost neutrofilnih granulocita, Phagoburst[®] - test procene respiratornog praska neutrofilnih granulocita

Navedenim ispitivanjima izvršena je procena nespecifičnih odbrambenih funkcija neutrofilnih granulocita u vidu respiratornog praska nakon procesa nastanka ROS u neutrofilnim granulocitima pune krvi svih krava pre i nakon teljenja. Na grafikonu 6.3.2.1. su prikazane srednje vrednosti i statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima za procenat neutrofilnih granulocita iz krvi koji su stvarali ROS. Prosečan intenzitet fluorescencije (MIF B) je prikazan na grafikonu 6.3.2.2., dok je njihov proizvod (indeks ROS reakcije označen kao Indeks B) u zavisnosti od termina peripartalnog perioda, prikazan na grafikonu 6.3.2.3.

U tabelama i grafikonima prikazanim u podpoglavlju 5.3.2. iznete su srednje vrednosti procenta i ocena statističke značajnosti razlika u srednjoj vrednosti procenta neutrofilnih granulocita krvi koji su izvršili respiratorni prasak, prosečan intenzitet respiratornog praska (MIF B) kao i indeks respiratornog praska pre i nakon teljenja.

Nakon fagocitoze dolazi do aktivacije mehanizama kojima fagociti, a posebno polimorfonuklearni leukociti mogu efikasno da unište fagocitovane mikroorganizme. Analiza respiratornog praska neutrofilnih granulocita i monocita krvi krava ima za cilj da ustanovi opšte odbrambeno stanje organizma krava u periodu pre i nakon teljenja (Milovanović, 2014).

Respiratornim praskom se utvrđuju mogućnost i snaga aktivacije prve linije urođenog imuniteta kroz intenzitet glikogenolize, pojačanje oksidacionih procesa i merenje nivoa

reaktivnih metabolita kiseonika velike toksičnosti (vodonik peroksida i peroksidnih anjona), koji se pri tome oslobađaju i uništavaju ingestirane čestice.

Analizirajući procenat neutrofilnih granulocita koji su ispoljili aktivnost respiratornog praska nisu ustanovljene statističke značajnosti u srednjim vrednostima između analiziranih grupa što se može objasniti značajnim individualnim variranjima i malim brojem analiziranih krava. Uprkos evidentnim oscilacijama u srednjim vrednostima (interkvartilna razlika od 10,42% i 13,17%) između rezultata analiza u prvoj nedelji pre teljenja, sa jedne strane i treće i šeste nedelje posle teljenja sa druge strane nije utvrđena statistička značajnost. Slično ovome, u ispitivanjima Meglia-je i sar. (2005), ni različita ishrana, ni termini vršenja analiza u peripartalnom periodu (-8 do +8 dana) nisu uticali na fagocitozu ili oksidativni prasak. Ukupna prosečna vrednost za procenat ćelija sa oksidativnim praskom u ovom ispitivanju je bila gotovo identična ($61,2 \pm 2,2\%$).

Grafički prikaz procenta ćelija koje su ispoljile aktivnost respiratornog praska sličan je nalazima dobijenim kod procene stepena fagocitoze (grafikon 5.3.1.1a.). Postoji porast aktivnosti do momenta teljenja, a zatim sledi pad (posmatrajući numeričke vrednosti). Međutim, ove razlike su statistički značajne i vrlo značajne u slučaju intenziteta (MIF B) i indeksa respiratornog praska, između svih grupa pre teljenja u odnosu na većinu grupa nakon teljenja. U trećoj i drugoj nedelji pre teljenja, registrovane vrednosti su bile signifikantno manje ($p < 0,01$) u odnosu na prosečne vrednosti indeksa u terminima nakon teljenja. Može se zaključiti da intenzitet respiratornog praska ispoljava značajne oscilacije posmatrano po danima laktacije i da postoji značajan ili statistički vrlo značajan rast intenziteta respiratornog praska pred teljenje, koji se nastavlja i dostiže najviše vrednosti u prvoj nedelji nakon teljenja, a zatim beleži kontinuirani pad prema šestoj nedelji laktacije. Udeo aktiviranih ćelija u ROS reakciji u našim ispitivanjima je gotovo identičan tokom istog perioda analize (prvih 28 dana postpartum) kao i u radu Meglia i sar. (2005) i kreće se oko 60%. Ovako visok odgovor je poželjan, pogotovo kod krava sa metabolizmom visokog intenziteta u tranzicionom periodu.

Moreira da Silva i sar. (1998) su uočili smanjenu metaboličku aktivnost neutrofilnih granulocita u vidu ROS produkcije sedam dana pre partusa, sa najnižom vrednošću trećeg dana nakon partusa. Slični rezultati ROS testa, kao i u našoj studiji, dobijeni su u istraživanjima Moya i sar. (2008), koji su pratili procenat ROS aktiviranih ćelija i intenzitet fagocitoze u sličnim vremenskim periodima (1 do 7 dana pre-partum kao i od 1. do 7. dana, 14. do 21. dana i 42. do 49. dana post-partum). Na grafikonu 5.3.2.1a. se jasno uočava visoka

ROS aktivnost neutrofilnih granulocita (slične vrednosti dobijene su u nedelji pre i posle teljenja), da bi usledio nagli pad od 14. dana laktacije pa nadalje. Ispitivanja Moya i sar. (2008) su takođe bila sprovedena na relativno malom broju krava u ogledu: po 12 prvotelkinja i 12 višetelkinja.

U studiji Mateus-a i sar. (2002) se opisuje smanjenje intenziteta respiratornog praska sa 80% aktiviranih ćelija, dve nedelje pred teljenje, na 50% u prvoj nedelji nakon teljenja. Zatim je oporavak tekao konstantno ka četvrtoj nedelji i ustalio se nadalje do kraja ispitivanja do sedme nedelje, sa oko 70% ROS pozitivnih ćelija ($p < 0,001$). Ova ispitivanja su obuhvatila krave sa fiziološkom involucijom, kao i krave sa srednje i teškim endometritisima koje su imale spontan oporavak u narednih 15 dana.

Međutim, ovakav trend promena intenziteta respiratornog praska je u suprotnosti sa rezultatima većeg broja autora (Gilbert i sar., 1993; Zerbe i sar., 1993; Kimura i sar., 2002; Milovanović, 2014.). Prema Gilbert-u i sar. (1993), krave sa zaostalom posteljicom su imale slabiju proizvodnju superoksidnih anjona u prvoj i šestoj nedelji posle teljenja. Kimura i sar. (2002) su ispitivanjem funkcija neutrofilnih granulocita, pre i nakon teljenja, u zavisnosti od pojave zaostale posteljice utvrdili da se mijeloperoksidazna aktivnost ovih ćelija krava sa zaostalom posteljicom, postepeno smanjivala pre teljenja sve do samog dana teljenja. U odnosu na kontrolnu grupu, razlike u srednjim vrednostima aktivnosti MPO su bile statistički značajne ($p < 0,01$) i potrajale su sve do druge nedelje nakon teljenja. Zerbe i sar. (2000) su dokazali da je udeo ROS aktivnih ćelija bio smanjen neposredno pre teljenja, ali je u naredne tri nedelje (kod zdravih krava) neprestano bio u porastu. Autori nisu izneli podatke o statističkoj značajnosti razlika u vrednostima registrovanim u navedenim vremenskim periodima već su poredili dobijene vrednosti (krivu) sa vrednostima kod krava koje su bolovale od zamašćenja jetre.

Milovanović (2014) navodi da neposredno nakon teljenja (u periodu od 1-15 dana) postoji statistički značajan pad srednje vrednosti procenta neutrofilnih granulocita u punoj krvi koji su izvršili respiratorni prasak ($p < 0,05$). Intenzitet respiratornog praska, slično intenzitetu fagocitoze neutrofilnih granulocita iz krvi, bio je podložniji promenama nakon teljenja, kada je uočeno značajno ili statistički vrlo značajno smanjenje, sa statističkom razlikom u indeksu respiratornog praska u prvih 15 dana laktacije u odnosu na period pre teljenja i nakon 16. dana laktacije. Posle 16. dana laktacije došlo je do postepenog oporavka, ali su vrednosti indeksa fluorescence respiratornog praska neutrofilnih granulocita iz krvi i

nakon 30 dana od teljenja ostale dvostruko niže od onih zabeleženih neposredno pre teljenja. Takođe je intenzitet respiratornog praska ispoljavao značajne oscilacije kako po danima laktacije, tako i odnosu na buduće reproduktivne performanse i on je označen kao pouzdan indikator u oceni odbrambenog statusa. Nasuprot ovom nalazu, fagocitna aktivnost (%) neutrofilnih granulocita je bila visoka tokom celokupnog peripartalnog perioda bez obzira na dane laktacije ili kasniji reproduktivni status i ne može se smatrati relevantnim parametrom za predviđanje toka involucije materice i pojavu endometritisa.

U nedavnom ispitivanju Vailati-Riboni-ja i sar. (2017) su ustanovljeni depresija fagocitoze i respiratornog praska kod krava u prvih 7 dana nakon teljenja, da bi u 14., a naročito 28. dana došlo do oporavka. Ova ispitivanja su vršena sa ciljem da se proceni uticaj peroralne suplementacije muznih krava protektiranim metioninom i holinom tokom tranzicionog perioda na imunski odgovor tokom peripartalnog perioda. Obe komponente su efikasno poboljšale odbrambene funkcije, ali je metionin veoma signifikantno uticao na povećanje intenziteta respiratornog praska i fagocitoze u postpartalnom periodu (do udvostručenja procenta ROS aktiviranih ćelija, sa $\approx 30\%$ na $\approx 60\%$). Ovi rezultati pružaju uvid u potencijalne imunomodulatorne efekte pojedinih aditiva hrane, i kao takvi, mogu imati primenu u formulaciji obroka krava zbog toga što je metionin izvor glutaciona i taurina, dva najvažnija ćelijska antioksidansa (Pompella i sar., 2003; Shimada i sar., 2015). Ovako visoke vrednosti, kod jedinki koje su dobijale obrok obogaćen metioninom približne su vrednostima dobijenim u našoj studiji. Potrebno je napomenuti da je kod krava uključenih u naša ispitivanja tokom tranzicionog perioda, korišćen dodatak hranivu sa omega-3-masnim kiselinama. Može se pretpostaviti da je i on ispoljio svoj uticaj kako na parametre funkcija neutrofilnih granulocita, tako i na reproduktivne parametre. Gandra i sar. (2016) su ustanovili pozitivan uticaj omega-3-masnih kiselina na procenat leukocita u cirkulaciji, monocita ili neutrofilnih granulocita koji su ispoljavali fagocitnu aktivnost pre i posle teljenja. Isti autori su ustanovili da masne kiseline kraćeg lanca (laneno seme) imaju veći uticaj na kapacitet fagocitoze i aktivnost leukocita u odnosu na masne kiseline dužeg lanca (soja).

6.3.3. Aktivnost mijeloperoksidaze - procena funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita

Alternativni način ocenjivanja funkcije neutrofilnih granulocita je određivanje aktivnosti mijeloperoksidaze, kao indikatora sposobnosti ovih ćelija da unište bakterije. Ova

metoda ima svoj značaj s obzirom da se funkcionalna sposobnost neutrofilnih granulocita ispituje ELISA testovima, dok su za većinu drugih analiza neophodni posebni mikroskopi sa fluorescentnim izvorom svetla ili uređaji za protočnu citometriju.

Test određivanja mijeloperoksidazne aktivnosti, u ispitivanjima ovog tipa, može poslužiti kao potvrda rezultata dobijenih protočnom citometrijom, i obratno. Mehanizam delovanja je u velikoj meri sličan: aktiviranjem fagocitoze (vezivanjem preko komponenti sistema komplementa ili antitela na površini neutrofilnih granulocita), dolazi do velikog povećanja potrošnje kiseonika i ATP-a, oslobađanja velike količine superoksidnih anjona na površini ćelija i u fagozomima. Posle spontane fuzije sa primarnim granulama, iz njih se oslobađa mijeloperoksidaza, koja katalizuje reakcije između hidrogen peroksida i hloridnih anjona kako bi se formirao hipohlorit. Hipohlorit zatim reaguje sa tirozinom i ostacima bakterijskih proteina (Hammon i sar., 2006). Hipohlorna kiselina je najmoćniji oksidans koji generišu neutrofilni granulociti u znatnim količinama i ona u velikoj meri doprinosi oštećenjima bakterija (Kettle i sar., 1997).

Analizirajući naše rezultate, dobijene ispitivanjem aktivnosti MPO, ustanovljen je sličan trend aktivnosti neutrofilnih granulocita sa vrednostima dobijenim analizom pomoću protočne citometrije (testom "Phagoburst"). Porast prosečne aktivnosti MPO je registrovan pre teljenja, da bi nakon teljenja došlo do naglog pada u prve dve nedelje, sa najnižim vrednostima u šestoj nedelji. Aktivnost registrovana u trećoj i šestoj nedelji nakon teljenja je bila signifikantno manja ($p < 0,01$), u odnosu na prosečne koncentracije prve nedelje pre i prve nedelje posle teljenja (tabela 5.3.3.1. i grafikon 5.3.3.1a.). Ovim se potvrđuju nalazi obe primenjene metode (protočna citometrija i ELISA), kao i valjanost dva korišćena komercijalna testa ("Phagoburst" test i ELISA Kit for Myeloperoxidase, Cloud-Clone CORP).

U rezultatima Hammon-a i sar. (2006) se navodi da je kod krava sa normalnim reproduktivnim statusom dolazilo do pada aktivnosti mijeloperoksidaze od prve nedelje pre teljenja pa sve do treće nedelje nakon teljenja, da bi oporavak usledio u četvrtoj i osmoj nedelji.

U obimnom ogledu Kimura i sar. (2002), kod 142 krave, analizirane u peripartalnom periodu (20 sa zaostalom posteljicom), izvršena je analiza aktivnosti mijeloperoksidaze. Aktivnost MPO je kod krava sa zaostalom posteljicom bila značajno niža u poređenju sa kravama bez zaostale posteljice u svim analiziranim periodima. Mijeloperoksidazna aktivnost neutrofilnih granulocita kod krava sa normalnim tokom puerperijuma nije se značajnije

menjala pre teljenja (osim blagog porasta neposredno pred teljenje), dok se ova aktivnost postepeno smanjivala kod krava sa registrovanom zaostalom posteljicom kako su se približavale teljenju i dostigle najnižu vrednost upravo na dan teljenja ($p < 0,01$). Nakon teljenja, vrednosti su konstantno opadale sve do 15. dana laktacije. Najveća razlika između ove dve grupe je primećena upravo na dan teljenja (dvostruko manja aktivnost kod krava sa reproduktivnim problemima). Ponovljena ispitivanja u drugoj laboratoriji ukazuju da se mijeloperoksidazna aktivnost kod krava sa i bez zaostale posteljice naglo povećava neposredno pred teljenje (5 dana pred partus), što je primećeno i u našim ispitivanjima (povećanje postoji 14 dana pre teljenja) (Kimura i sar., 2002).

6.3.4. Rezime pokazatelja funkcionalne aktivnost neutrofilnih granulocita

U ovom podpoglavlju diskusije je izneta analiza povezanosti funkcija neutrofilnih granulocita krvi sa vrednostima metaboličkih indikatora koji ukazuju na funkcije jetre, mineralnog metabolizma u puerperalnom periodu, hematoloških parametara kao i pojedinih proizvodnih i reproduktivnih pokazatelja krava uključenih u ispitivanja tokom prvih 120 dana laktacije.

Kao što je izneto u pregledu literature i u diskusiji, u većini publikovanih radova preovlađuju dokazi da su urođeni i stečeni odbrambeni mehanizmi najslabiji (najniže izmerene vrednosti parametara koji ukazuju na funkcije neutrofilnih granulocita) od treće nedelje pre teljenja, pa sve do treće nedelje posle teljenja. Ovo se uočava, kako na sistemskom nivou, tako i kod ciljnih organa kod kojih postoje najintenzivnije promene (prvenstveno mlečnoj žlezdi i materici). To ima za posledicu veću učestalost pojave oboljenja u peripartalnom periodu nastalih kao posledica hormonalnih i metaboličkih promena, fizičkog napora tokom kasnog graviditeta, teljenja i laktacije. Međutim, postoje i studije čiji rezultati ukazuju na znatne varijacije u stepenu otpornosti između pojedinih plotkinja povezane sa različitim genotipom i fenotipom. Data je preporuka da se ove osobine mogu koristiti za identifikaciju krava sa visokom otpornošću u toku peripartalnog perioda, što bi bilo od koristi u selekciji. Posebno bi bilo od značaja da se identifikuju geni koji imaju pozitivan uticaj na otpornost domaćina (Mallard i sar., 1998). Fokus brojnih savremenih studija je u iznalaženju metoda stimulacije imunskog sistema, kako na opštem (Vailati-Riboni i sar., 2017), tako i na lokalnom nivou. Tako se navodi mogućnost intrauterine primene imunomodulatora kao

alternativni pristup u terapiji endometritisa (Hussain i Daniel, 1992; Singh i sar., 2000; Palanisamy i sar., 2015) ili u kontroli i eliminaciji stresnih faktora (Yagi i sar., 2004).

Pre donošenja konačnog zaključka u vezi odbrambenih funkcija neutrofilnih granulocita treba razmotriti i istaći i generalna zapažanja u vezi opšteg zdravstvenog stanja grupe ispitivanih krava, promena u oceni telesne kondicije, reproduktivnih i proizvodnih rezultata. Ovo je potrebno posebno analizirati u svetlu promena vrednosti metaboličkih (biohemijskih) parametara i njihovog uticaja na funkcije neutrofilnih granulocita koji je, donekle, u našim ispitivanjima bio različit u odnosu na nalaze drugih autora.

Ključni fiziološki procesi u peripartalnom periodu su pojačana mobilizacija i promene u metabolizmu masti koje se dovode u vezu sa zdravstvenim poremećajima (Zerbe i sar., 2000; Kaufmann i sar., 2010; Van Saun, 2016). Mobilizacija masti iz masnih tkiva počinje u poslednjoj nedelji steonosti (Vazquez-Anon i sar. 1994) usled hormonalnih promena koje intenziviraju glukoneogenezu (Vasilatos i Wangsnes, 1981, Holtenius i sar., 1993), što rezultira povećanjem koncentracije slobodnih masnih kiselina u krvi pre teljenja (Studer i sar., 1993) i sa najvišim vrednostima nakon teljenja (Kovačević i sar., 1999). U našim ispitivanjima je kretanje koncentracije NEMK bilo u skladu sa nalazima drugih, spomenutih autora i takođe je utvrđen postepen porast vrednosti ovog parametra pre teljenja sa vrhuncem u prvoj nedelji laktacije, a zatim je usledio postepen pad. Smatra se da koncentracije NEMK, veće od 0,4 mmol/l u poslednjih 7 do 10 dana pre teljenja povećavaju rizik za brojne zdravstvene poremećaje koji mogu dovesti do prevremenog isključenja iz proizvodnje (Le Blanc, 2010). Međutim, Martinez i sar. (2012) nisu utvrdili ovu vezu, a Suriyasathaporn i sar. (2000), pored samog intenziteta, ističu i dužinu trajanja NEB kao bitan faktor u razvoju imunosupresije kod plotkinja. U skladu sa ovim navodima, u našim ispitivanjima, porast koncentracije NEMK u prvoj nedelji nakon teljenja na 1,05 mmol/l i pad već sledeće nedelje na 0,8 mmol/l nisu imali uticaja na funkcionalnu aktivnost neutrofilnih granulocita. Isti model kretanja tokom perioda ispitivanja kao i NEMK ispoljile su: koncentracija BHB, koncentracija ukupnog bilirubina i aktivnost AST. Vrednosti BHB između 1,2 i 1,4 mmol/l ukazuju na supkliničku ketozu u prve dve nedelje i povećan rizik za niz poremećaja zdravlja i plodnosti (Le Blanc, 2010). Dvostruki skok u koncentraciji BHB između vrednosti pred teljenje i nedelje nakon teljenja u našim rezultatima je i dalje bio ispod vrednosti od 2,5 mmol/l, za koju Kaufmann i sar. (2010) navode da utiču na intenzitet respiratornog praska. Koncentracija od $0,74 \pm 0,43$ mmol/l u prvoj nedelji nakon teljenja nije uticala na procenat neutrofilnih granulocita koji su odgovorili respiratornim praskom, ali je uočena

promena intenziteta respiratornog praska koji je bio statistički značajno veći u nedelji nakon teljenja u odnosu na nedelju pre. Povišenje vrednosti ukupnog bilirubina i pojačana aktivnost enzima AST ukazuju na oštećenja hepatocita, usled nakupljanja masti u njima (Horvat i Jovanovic, 1999). U našem ispitivanju, funkcije jetre nisu bile značajnije kompromitovane i smatramo da je njeno zamašćenje u postpartalnom periodu bilo u okviru fiziološkog. Tokom izvođenja naše studije nisu utvrđeni zdravstveni poremećaji koji se mogu dovesti u vezu sa preobilnom mobilizacijom masti i stvaranjem ketonskih tela.

Iako je kod pojedinih krava utvrđena značajnija mobilizacija NEMK i blago povišena koncentracija BHB, dobijene vrednosti pokazatelja funkcije neutrofilnih granulocita nisu ispoljile pad nakon teljenja, šta više bile su u pozitivnoj su korelaciji sa koncentracijom NEMK i BHB. Različita tkiva mogu da koriste BHB, u cilju štednje glukoze, kao izvor energije (Holtenius, 1996) što je možda bio razlog pozitivne korelacije sa pokazateljima aktivnosti neutrofilnih granulocita. Izostanak slabljenja funkcija neutrofilnih granulocita se može objasniti i time da glikemija nije značajnije oscilovala, iako je utvrđena negativna korelacija sa procentom neutrofilnih granulocita koji su reagovali fagocitozom, kao i sa intenzitetom fluorescencije respiratornog praska neutrofilnih granulocita u sedmom danu pre i posle teljenja. Gubitak telesne mase takođe nije bio izražen, što ukazuje da su homeoretski mehanizmi uspevali da održe energetski bilans bez većih posledica po zdravstveno stanje. Koncentracija glukoze u krvnom serumu nije značajnije varirala tokom našeg ispitivanja. Glukoza je veoma značajan izvor energije za ćelije imunskog sistema, a ona im je tokom čitavog perioda ispitivanja bila dostupna u dovoljnoj količini. Bez obzira na činjenicu da je registrovan pad njene koncentracije u prvoj nedelji nakon teljenja, registrovane vrednosti su i dalje bile u okviru fizioloških granica. U prilog očuvanoj funkcionalnoj sposobnosti jetre govore i vrlo stabilne koncentracije ukupnih proteina, albumina i globulina koje su bile u fiziološkim okvirima tokom celog perioda ispitivanja.

Koncentracije Ca, P i Mg u krvnom serumu su tokom ispitivanja bile u fiziološkim okvirima, a istovremeno nije bilo zdravstvenih poremećaja u čijoj osnovi leži poremećaj metabolizma navedenih minerala. Statistički značajne razlike koje su utvrđene među pojedinim danima uzorkovanja ukazuju na aktivne i efikasne homeoretske mehanizme.

Prema tome, kod krava uključenih u ova ispitivanja konstantno su pojačavani odbrambeni mehanizmi i to od tri nedelje pre teljenja sve do prve nedelje nakon njega. Slabljenje funkcija neutrofilnih granulocita nije bilo u ovom slučaju dominantna pojava, već

se kako protiče oporavak nakon teljenja, zapažao veoma postepen pad aktivnosti neutrofilnih granulocita ka šestoj nedelji. Čini se da su odbrambeni mehanizmi racionalni i dozno zavisni u odnosu na "pretnje i izazove" tranzicionog perioda. Oni su jačali neposredno pred teljenje i bili su visoko aktivni u prvim nedeljama, a zatim je nastupila brza stabilizacija šeste nedelje nakon teljenja.

Naizgled kontradiktorni rezultati upravo ukazuju na složenost odbrambenih mehanizama ukoliko se uzmu u obzir sve okolnosti koje mogu presudno uticati na dobar ili loš tranzicioni menadžment. Krave koje su bile uključene u ovu studiju su imale dobre zdravstvene pokazatelje tokom tranzicionog perioda. Zabeležena su samo dva slučaja zaostale posteljice bez kliničkih komplikacija i ozbiljnijih tretmana. Kod 33,33procenata krava zabeležena su sporadična povećanja broja somatskih ćelija na mesečnim analizama mleka.

Krave su imale gotovo idealne i ujednačene ocene telesne kondicije (OTK) prilikom ocenjivanja 3 nedelje pred teljenje. U trećoj nedelji pre teljenja OTK vrednost je bila $3,65 \pm 0,27$, dok je u šestoj nedelji nakon teljenja, kada su krave bile na vrhuncu laktacije, OTK, iznosila $3,33 \pm 0,53$. Time je prosečan gubitak telesne kondicije iznosio svega $0,32 \pm 0,45$ OTK. Prema proceni Otto-a i sar. (1991), jedna ocena telesne kondicije približno je ekvivalentna 55 kg telesne mase odrasle krave holštajn rase, onda je prosečan gubitak telesne mase u proseku iznosio svega $17 \pm 24,75$ kg nakon teljenja. Poznato je da je plodnost krava pod uticajem energetskog bilansa i zdravstvenog stanja već 2-3 meseca pre perioda osemenjavanja. Isto tako, krave sa izraženim negativnim energetskim bilansom imaju oštećenja u populaciji folikula koji se pripremaju za ovulaciju, čije se posledice ispoljavaju čak i 2 do 3 meseca kasnije. Krave sa velikim smanjenjem telesne mase (više od 0,5 OTK u ranoj laktaciji), imaju produženo trajanje estrusa, odnosno veći broj dana do ovulacije i znatno smanjen procenat koncepcije u prva tri osemenjavanja (Senatore i sar., 1996). Kravama koje u toku prvih 5 nedelja laktacije izgube više od jednog poena u OTK, treba više vremena do pojave prve koncepcije (duži servis period), u odnosu na krave koje su izgubile manje od 1,0 OTK. Smatra se da je to je pre posledica smanjenog unosa hrane i slabijeg apetita, nego visoke proizvodnje (Smith i sar., 1983).

U istraživanju Milovanovića (2014), između grupa krava kod kojih je došlo do promene (gubitka) za manje od jedne ocene telesne kondicije nakon teljenja i grupe u kojoj je taj gubitak bio veći od jedan, postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima dužine servis perioda ($135,13 \pm 60,85$ prema $208,50 \pm 37,39$; $p < 0,05$), kao i postignutoj

steonosti do prvih 150 dana laktacije (68,18% prema 23,53%; $p=0,01$). Za ostale ispitane parametre (redosled laktacije, broj dana laktacije za prvo i poslednje veštačko osemenjavanje i za količinu proizvedenog mleka) nisu ustanovljene statistički značajne razlike.

U našem ispitivanju su krave praćene do 120. dana laktacije. Postignuta je steonost kod 13/21 krave (61,90%), vreme do prvog osemenjavanja je iznosilo $60,27 \pm 13,77$ dana, uz servis period od $71,91 \pm 19,44$ dana i utrošak doza semena (indeks osemenjavanja) po steonoj kravi od $1,36 \pm 0,50$. Dve krave iz ogleda su planirano izostavljene iz dalje reprodukcije usled hromosti. Kod jedne krave je zabeležen graviditet sa tri teleta i do teljenja je došlo 2 nedelje ranije uz uginuće jednog teleta, tako da dalje osemenjavanje nije planirano usled problema sa opštim zdravstvenim stanjem. Navedene činjenice ukazuju na dobar reproduktivni menadžment farme.

Proizvodnja mleka je, kod krava uključenih u naša ispitivanja, bila takva da su mesečna merenja izvršena na prve tri kontrole nakon teljenja, ukazala da je prosečna proizvodnja $28,40 \pm 8,76$ litara mleka, što odgovara proizvodnji od 2,316 l/100 dana laktacije ili 7,082 l, obračunato na 305 dana laktacije (standardna laktacija).

Ukupno je izvršeno 80 kontrola mleka na prisustvo somatskih ćelija i kod 18 merenja (22,5%), odnosno, kod 8/21 krave (38,09%) zabeležen je barem jedan skok broja somatskih ćelija (preko 200,000). Pri tome nije bilo kliničkih znakova mastitisa niti potrebe za tretmanom usled upalnih procesa vimena.

Prosečne vrednosti hematoloških i biohemijskih i parametara krvi, uprkos manjim oscilacijama su uglavnom bile u saglasnosti sa dobrim zdravstvenim stanjem, proizvodnim i reproduktivnim rezultatima što ukazuje na dobar tranzicioni menadžment. Pokazatelji dobrog stanja krava su i kratak servis period, mali utrošak doza semena po steonoj kravi i visok procenat steonosti u prvih 120 dana laktacije. Pri tome je bila ostvarena solidna proizvodnja mleka, uz minimalni gubitak telesne kondicije. Homeoretski mehanizmi su u potpunosti bili efikasni i potpomognuti odgovarajućom ishranom, negom i smeštajem.

Kritične tačke fiziološke adaptacije krava i poznati faktori rizika za nastanak bolesti (indirektno nastali usled slabijih odbrambenih mehanizama) su generalno identifikovane i ovde će biti razmotren njihov uticaj na funkcije neutrofilnih granulocita tokom tranzicionog perioda. Aktivaciji neutrofilnih granulocita je pogodovalo više faktora. Indikatori metabolizma jetre (koncentracije BHB, NEMK, albumina i globulina) i koncentracija minerala

u krvi su bili povoljni i u fiziološkim granicama. Parametri opterećenja jetre su bili stabilni. Indikatori zamašćenja jetre, BHB i NEMK, kao i male promene u OTK (telesnoj masi), nisu ispoljavali značajnije oscilacije kada se uporede prosečne vrednosti merene tri nedelje pre teljenja, u odnosu na šestu nedelju nakon teljenja. Visok nivo NEMK i BHB smanjuje migratornu sposobnost, intenzitet fagocitoze i moć razlaganja unetih partikula i/ili respiratorni prasak neutrofilnih granulocita i drugih vrsta leukocita i time doprinosi povećanoj osetljivosti prema patogenima (Sartorelli i sar., 1999, 2000; Zerbe i sar., 2000). U našoj studiji niske vrednosti ovih parametara nisu ispoljile negativno dejstvo na ćelije nespecifičnog imunskog odgovora.

Prema Mateus-u i sar. (2002), uprkos činjenici da je perzistencija infekcije kod krava sa teškim oblicima endometritisa znatno duža od onih koji su klasifikovani kao blagi, nema promena u profilu i funkcijama leukocita poreklom iz krvi. Fagocitoza je od strane neutrofilnih granulocita iz krvi bila konstantno visoka i tokom normalnog puerpuerijuma što potvrđuju i drugi autori (Kehrli i sar., 1989; Hoedemaker i sar., 1992; Zerbe i sar., 1998; Milovanović, 2014), ali je ovaj fenomen zapažen i kod krava sa puerpualnim endometritisom (Cai i sar., 1994). Prema tome, fagocitna aktivnost neutrofilnih granulocita krvi verovatno nije ključan faktor za nastanak i dužinu trajanja endometritisa. Nasuprot ovome, razlike se javljaju usled narušene funkcije respiratornog praska neutrofilnih granulocita u vidu smanjenja aktivnosti MPO i proizvodnje peroksida (Hoedemaker i sar. 1992; Cai i sar., 1994; Moreira da Silva i sar. 1997; Zerbe, 1998), što je bio slučaj i u našoj studiji.

Iz svega što je navedeno, može da se zaključi da još uvek ne postoji puna saglasnost i uniformno mišljenje o promenama funkcija fagocitnih ćelija iz sistemske cirkulacije tokom različitih fizioloških i patoloških stanja i pojedinih biohemijskih parametara, ocene telesne kondicije, pariteta, uslova smeštaja i ishrane i izloženosti stresu u peripartalnom periodu. Na ove funkcije se očigledno, može uticati dobrom ishranom, smeštajem, pravilnim tranzicionim menadžmentom, korišćenjem neophodnih mineralno-vitaminskih dodataka kao i komponenti koje stimulišu odbrambene mehanizme u kritičnom periodu (-3 do +3 nedelje u odnosu na teljenje). Moguće "izbegavanje" pada odbrambenih snaga karakteristično za visoko-produktivne krave sa visokim gubicima OTK može i mora biti ključni faktor za uspostavljanje dobre reprodukcije i proizvodnje neposredno nakon teljenja i tokom prvih 100 dana laktacije.

6.4. Uticaj egzogenih faktora na funkcionalnu aktivnost neutrofilnih granulocita

Svaka vrsta promene u imunološkom sistemu, bilo da je u pitanju aktivacija ili inhibicija njegovih funkcija naziva se imunomodulacija. Imunomodulatori su supstance koje su sposobne da reaguju sa komponentama imunskog sistema i da dovedu do njegove stimulacije, inhibicije i/ili obnove (Chauhan i sar., 2014). Efikasan i robustan urođeni imunski sistem, bitan je za efikasno uklanjanje stranih antigena, ali i za ubrzavanje adaptivnog imunskog odgovora i sprečavanje napredovanja patoloških procesa u organizmu. Urođeni imunski odgovor predstavlja prvu liniju obrane i svoju funkciju ostvaruje putem fagocitoze za koju su odgovorni makrofagi i neutrofilni granulociti, Na čitav ovaj proces utiču brojni faktori. Izučavanje prirodnih supstanci i njihovih imunomodulatornih sposobnosti privlači u nauci sve veću pažnju. Uticaj egzogenih faktora na urođeni imunski odgovor može imati važnu ulogu u prevenciji različitih bolesti. U poslednjih nekoliko godina postoji sve veći interes za prirodnim proizvodima kao alternativnoj i/ili komplementarnoj terapiji u do sada uobičajenim protokolima. Klasični lekovi i tretmani često nisu dovoljno efikasni i ispoljavaju značajna neželjena dejstva, pa se upotrebom prirodnih sredstva teži poboljšanju efikasnosti terapije.

Odgovarajući efekat etarskog ulja (EU) zavisi od njegovog hemijskog sastava. U našem istraživanju, gasnom hromatografijom je utvrđena zastupljenost aktivnih principa za svako etarsko ulje. Kod etarskog ulja timijana među 69 utvrđenih jedinjenja, dominantni sastojci su: timol (34,41%), *p*-cimen (34,04%) i karvakrol (4,92%). Hemijskom analizom etarskog ulja rtanjskog čaja identifikovano je 82 sastojaka, a dominiraju karvakrol (42,12%) i limonen (24,57%). Analizom hemijskog sastava ulja mente identifikovano je 83 jedinjenja, a u najvišim koncentracijama su prisutni: mentol (36,74%), menton (18,81%), mentil-acetat (9,42 %) i limonen (5,99%).

U brojnim istraživanjima se ističe uticaj klimatskih uslova, tipa zemljišta, nadmorske visine i temperature na sastav EU. Svaka procena njihove aktivnosti, ukoliko se ne uzimaju u obzir ove činjenice, može biti pogrešna (Tepe i Cilkiz, 2016). Marin i sar. (2012) su, upoređujući hemijski sastav *S. Montana* uočili da je karvakrol dominantna komponenta etarskih ulja sa područja Dalmacije, Biokova i Brača, dok na jugu Hrvatske isto ovo etarsko ulje kao dominantnu komponentu ima timol (30,88–46,02%), a sadržaj karvakrola je svega 3,81- 6,86%. *Satureja Montana* iz zapadne Srbije je kao dominantnu komponentu u njihovom

istraživanju imala linalool i p-cimen, a karvakrol je bio zastupljen sa svega (0,4%). U uzorcima iz Makedonije je sadržaj karvakrola iznosio 18,3%. Kontradiktornosti koje se javljaju u literaturi upravo se mogu objasniti razlikama u hemijskom sastavu, korišćenju različite metodologije i različitih koncentracija tokom ispitivanja, ali i usled korišćenja različitih životinjskih vrsta tokom istraživanja. Pri tome se efekat istog EU može značajno razlikovati.

Najviše su izučavani antibakterijski, antiinflamatorni i antimikotični efekti EU. Dosadašnja istraživanja su dokazala da pojedina EU imaju uticaj na zdravlje i produktivnost životinja, smanjuju stres i imaju sposobnost uticaja na funkcije imunskog sistema (Oh i sar., 2016). Imunomodulatorna uloga biljnih preparata je najviše proučavana kod monogastričnih životinja, a u poslednje vreme se povećava broj istraživanja i kod preživara. U literaturi su najbrojniji podaci o imunomodulatornoj ulozi pojedinih etarskih ulja u *in vivo* istraživanjima vršenim dodavanjem etarskih ulja u hraniva (Benchaar i sar., 2008; Kung i sar., 2008, Tassoul i Shaver, 2009; Oh i sar., 2013; Oh i sar., 2015). Podaci o uticaju EU na fagocitozu do sada su najviše proučavani kod ljudi i na laboratorijskim životinjama. U poslednje vreme su intenzivirana istraživanja na ribama. O uticaju etarskih ulja na neutrofilne granulocite kod goveda skoro da i nema podataka. Hu i sar. (1992) su ukazali na sposobnost EU da poboljšaju odbranu organizma proučavajući uticaj 26 različitih etarskih ulja na izolovane neutrofilne granulocite kod goveda. Autori su zapazili izražen dozno-zavisni efekat pri čemu su veće doze su ispoljavale inhibitorni efekat, a niže doze stimulatívni.

Poznato je da biljke iz familije *Lamiaceae* mogu uticati na imunski odgovor (Zgorka i Głowniak, 2001; Vatter i sar., 2013; Orhan i sar., 2016), što autori uglavnom pripisuju prisustvu fenolnih jedinjenja. Od fenolnih jedinjenja, među ispitivanim EU su najzastupljeniji timol i karvakrol (kod etarskih ulja timijana i rtanjskog čaja). Kod etarskog ulja mente dominiraju monoterpeni: mentol i menton. Iako postoje mnogobrojna istraživanja EU, poznavanje tačnog mehanizma delovanja, njihov metabolizam, kao i optimalne doze nisu poznati.

U našem istraživanju, tretman pune krvi različitim koncentracijama etarskih ulja nije uticao na fagocitnu sposobnost neutrofilnih granulocita. Nijedno EU nije uticalo na povećanje ovog procenta, ni pre ni posle teljenja. Intenzitet fluorescencije fagocitoze kao i indeks su imali najveće vrednosti u uzorku pune krvi bez tretmana, ali bez statističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima. Vrednosti dobijene u našem istraživanju ukazuju da nije bilo

stimulacije fagocitoze u uzorcima pune krvi pod dejstvom ispitivanih koncentracija EU ni pre ni posle teljenja.

Prema hemijskom sastavu, etarsko ulje timijana kao dominantnu komponentu ima timol. Chauhan i sar. (2014) su ispitujući uticaj timola na makrofage ustanovili značajno povećanje stepema fagocitoze pri svim ispitivanim koncentracijama timola. Timol je u višoj koncentraciji (150 mmol/l) ispoljio veću aktivnost nego u druge dve niže koncentracije (50 i 100 mmol/l). Imunostimulatorno dejstvo su autori objasnili uticajem timola na propustljivost ćelijske membrane, čime se povećava kapacitet fagocitovanja čestica. Iako je timol dominantna komponenta i u etarskom ulju timijana u našem istraživanju, takvi rezultati nisu dobijeni. U našem istraživanju statistički značajan uticaj timijana na fagocitozu nije bio dokazan što je skladu sa rezultatima drugih autora (Emeish i El-deen, 2016). Pérez-Rosés i sar. (2015) su proučavajući uticaj EU na fagocitozu neutrofilnih granulocita ljudi, uglavnom uočili inhibitorni efekat. Među 15 različitih EU ispitivanih u ovom istraživanju, timol je kao aktivna komponenta mnogih etarskih ulja, u najvišoj ispitivanoj koncentraciji pokazao najizraženije inhibitorno dejstvo. Razlike u rezultatima mogu se objasniti različitim metodologijom i poreklom ćelija koje su izučavane. Etarsko ulje timijana u koncentraciji T3 (0,025% ekstrakt timijana), povećalo je procenat neutrofilnih granulocita koji su pokazali aktivnost respiratornog praska u nedelji pre teljenja, dok je u koncentraciji T4 (0,0125% ekstrakt timijana) uočeno najizraženije inhibitorno dejstvo od svih ispitivanih tretmana (tabela 5.5.4.1. i grafikon 5.5.4.1a.).

Interesantno je da, iako je u nedelji pre teljenja, etarsko ulje timijana u koncentraciji T4 pokazalo izrazito inhibitorno dejstvo na procenat neutrofilnih granulocita koji su ispoljili aktivnost respiratornog praska (tabela 5.5.4.1. i grafikon 5.5.4.1a.), nakon teljenja je ono pojačalo intenzitet fluorescence neutrofilnih granulocita koji su ispoljili aktivnost respiratornog praska (tabela 5.5.5.2. i grafikon 5.5.5.2a.), kao i indeks praska (tabela 5.5.6.2. i grafikon 5.5.6.2a.) i to statistički značajno u odnosu na vrednosti pre teljenja. Intenzitet fluorescencije je nakon teljenja bio pojačan i u koncentraciji T3 (0,025% timijan).

U našem istraživanju nije uočen uticaj etarskog ulja rtanjskog čaja na fagocitozu neutrofilnih granulocita, iako u njegovom sastavu dominira karvakrol, koji je zajedno sa timolom kao što navode Amirghofran i sar. (2011) nosilac imunomodulatorne aktivnosti. Međutim, etarsko ulje rtanjskog čaja je uticalo na respiratorni prasak i ispoljilo stimulatívni efekat u koncentraciji R2 (0,05% Rtanjski čaj) nakon teljenja, i to u pravcu povećanja

procenta neutrofilnih granulocita koji su ispoljili aktivnost respiratornog prasaka (tabela 5.5.4.2. i grafikon 5.5.4.2a.). Pre teljenja ono nije uticalo na promenu procenta neutrofilnih granulocita, ali je intenzitet reakcije pre teljenja bio statistički značajno manji od intenziteta reakcije neutrofilnih granulocita u uzorku pune krvi bez tretmana (tabele 5.5.4.1. i 5.5.5.1.).

Prema rezultatima pojedinih autora, ekstrakti mente u ishrani riba poboljšavaju performanse rasta, imaju stimulaturna dejstva na urođeni imunitet (i na lokalnom i na sistemskom nivou) i utiču na hematološke parametre u smislu porasta broja belih krvnih ćelija, hematokritske vrednosti i sadržaja hemoglobina (Abasali i Mohamada, 2010; Talpur i sar., 2014; Adel i sar., 2015). Talpur i sar. (2014) ističu stimulatorno dejstvo mente na fagocitnu aktivnost u *in vivo* uslovima. U našem istraživanju, menta nije uticala na fagocitozu od strane neutrofilnih granulocita, ali razlike u rezultatima eventualno mogu da se objasne *in vitro* uslovima u kojima je sprovedeno naše istraživanje, kao i drugom vrstom životinja koje su ispitivane. Etarsko ulje mente u koncentraciji M1 (0,1% menta) povećalo je procenat neutrofilnih granulocita koji su ispoljili aktivnost respiratornog prasaka u nedelji pre teljenja. Nakon teljenja, EU mente je u M1 koncentraciji (0,1% menta) imalo izražen efekat upravo u pravcu pojačavanja intenziteta reakcije, statistički značajno veće u odnosu na vrednosti pre teljenja. Istraživanja na neutrofilnim granulocitima ljudi sa različitim vrstama mente dokazala su koliko farmakološka aktivnost zavisi od vrste, ali i od geografskog porekla (Cosentino i sar., 2009). Etarska ulja dobijena od iste vrste, ali uzgajane na različitim lokalitetima, su u istim koncentracijama ispoljavala različite efekte. Bez odgovarajućeg stimulatora ova EU nisu mogla ispoljiti bilo kakav efekat. Kod neutrofilnih granulocita pobuđenih slabijim stimulatorom (fMLP), etarsko ulje sa severa Lombardije, stimuliše respiratorni prasak, dok isto etarsko ulje sa područja Val Formazza (regija Pijemont) stimuliše respiratorni prasak kod neutrofilnih granulocita, ali samo kad su pobuđeni jakim stimulatorom (PMA). Etarsko ulje mente sa područja Laimburg (Tirolska regija) nije ispoljilo značajnije efekte na funkcije neutrofilnih granulocita. U istraživanjima Orhan-a i sar. (2016), etarsko ulje mente nije uticalo na respiratorni prasak neutrofilnih granulocita i produkciju interleukina. Razlike u podacima iz literature upravo ukazuju koliko etarsko ulje iste biljne vrste, izolovano istom metodom, ali iz materijala prikupljenog u različitim vegetativnim fazama ili sa različitog geografskog područja, može da se razlikuje u ispoljavanju odgovarajuće farmakološke aktivnosti. Efekat etarskog ulja ne zavisi samo od dominantne komponente, već i od sastojaka zastupljenih u manjim količinama, ali i od velikog variranja sadržaja istih komponenti u istoj biljnoj vrsti. Pérez-Rosés i sar. (2015) su utvrdili da karvakrol ima bolje dejstvo sam, nego etarsko ulje

origana u kojem je karvakrol dominantna aktivna supstanca. Etarsko ulje crvenog timijana je međutim bilo efekasnije nego sam timol koji je u etarskom ulju glavna komponenta. Ovakvi rezultati ukazuju da i komponente zastupljene u malim koncentracijama mogu značajno uticati na efekat koji će etarsko ulje ispoljiti. Zgorka i Głowniak (2001), kao i Kozłowska i sar. (2015), objašnjavaju imunomodulatornu aktivnost etarskog ulja timijana prisustvom fenolne komponente - rozmarinske kiseline.

Tretman pune krvi različitim koncentracijama antiseptika takođe nije uticao na sposobnost neutrofilnih granulocita da vrše fagocitozu. Nakon inkubacije neutrofilnih granulocita ljudi u trajanju od 2h sa antiseptikom Armenicum[®] u koncentracijama 1:10, 1:50 i 1:100, Davtyan i sar. (2004) su utvrdili smanjenje procenta ovih ćelija koje ispoljavaju aktivnost fagocitoze ($p = 0,04$), kao i samu efikasnost ovog procesa ($p < 0,008$). Međutim, razređenja od 1:200 i 1:500 nisu imala uticaja na ovu funkciju. U našem istraživanju, korišćena su i veća razređenja (1:800, 1:1600), ali uticaj na fagocitozu takođe nije uočen. Osim toga, inkubacija je u našem ispitivanju bila kratka, tako da ni inhibitorni efekat nije bio izražen. Ovo je u skladu sa rezultatima Davtyan-a i sar. (2004) koji su utvrdili da postoji pozitivna korelacija između dužine vremena inkubacije i smanjenja procenta ćelija koje vrše fagocitozu.

Prema rezultatima istraživanja Davtyan-a i sar. (2004), Armenicum[®] u koncentraciji od 1:200 stimuliše respiratorni prasak snažnije nego slabi stimulator (fLMP) ($p < 0,01$). Koncentracija od 1:100 inhibira respiratorni prasak i to ne samo kod neutrofilnih granulocita, nego i kod monocita ($p < 0,03$) i ovaj efekat je izraženiji nego u koncentracijama od 1:200 i 1:400. Isti autori navode da je Armenicum[®] imunomodulator i da je sposoban da izmeni respiratorni prasak neutrofilnih granulocita i monocita. Uticaj zavisi od dužine inkubacije, kao i kod fagocitoze. Iako nismo ustanovili doznu zavisnost, u našem istraživanju je Armenicum[®] u koncentracijama 1:800 (A4) i 1:1600 (A5) stimulisao respiratorni prasak. U našoj studiji je dokazano da je Armenicum[®], u koncentracijama A4 (1:800) i A5 (1:1600) delovao imunostimulativno i pre i posle teljenja. Pre teljenja, Armenicum[®] je u koncentraciji A4 (1:800) ispoljio izraženiji efekat, a u koncentraciji A5 (1:1600) nakon teljenja, ali bez statističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima. Statistički značajne razlike su utvrđene u vrednostima intenziteta fluorescencije i indeksa respiratornog praska neutrofilnih granulocita pre (tabele 5.5.5.1. i 5.5.6.1.) i posle teljenja (tabele 5.5.5.2. i 5.5.6.2.), pod dejstvom tretmana i u koncentraciji A4 (1:800) i koncentraciji A5 (1:1600).

Ovi rezultati se mogu objasniti činjenicom da su ispitivane ćelije dostigle svoj maksimum u odgovoru na stimulans. U uzorcima bez tretmana, neutrofilni granulociti pobuđeni jakim stimulatorom (PMA), ispoljili su veliku spremnost za fagocitozu. U uzorcima pune krvi pre teljenja čak 87,15% neutrofilnih granulocita je imalo fagocitnu aktivnost, a nakon teljenja je taj procenat bio još veći: 90,13%, tako da dodatna stimulacija egzogenim faktorima nije bila moguća. Za razliku od fagocitoze, respiratorni prasak neutrofilnih granulocita je bio slabiji nakon teljenja i ovde je uočeno, ne samo povećanje broja neutrofilnih granulocita koji su ispoljili aktivnost respiratornog praska, već i pojačavanje intenziteta ove reakcije, a samim tim i indeksa respiratornog praska. Ustanovljena su i statistički značajna odstupanja između vrednosti registrovanih nedelju dana pre i nedelju dana nakon teljenja kod istih tretmana. Najbolji efekat je zabeležen upravo nakon teljenja u pravcu pojačavanja intenziteta reakcije u odnosu na vrednosti koje je pre teljenja imala menta u koncentraciji M1 kao i tretmani T4 (0,0125% timijan), A4 (1:800) i A5 (1:1600), koji su pozitivno uticali i na intenzitet i na indeks respiratornog praska neutrofilnih granulocita. Potrebna su dalja ispitivanja na većem broju jedinki i proučavanje većeg broja doza za ove supstance, kako bi se utvrdila eventualna dozna zavisnost. Takođe je neophodno detaljnije ispitati inhibitorni efekat EU, zbog toga što u pojedinim situacijama smanjena fagocitna aktivnost, uzrokovana etarskim uljima, može biti dobra strategija za ublažavanje stepena virusne ili bakterijske infekcije. Postoje dokazi da određeni mikroorganizmi slabe zaštitne funkcije neutrofilnih granulocita i na taj način povećavaju podložnost infekciji.

6.4.1. Rezime uticaja egzogenih faktora na funkcionalnu aktivnost neutrofilnih granulocita

Probe dodavanja EU i Armenicum[®] bez jakih stimulatora respiratornog praska nisu imale efekat pokretanja ROS reakcija *per se*. Kao nosač (razređivač) etarskih ulja korišćen je DMSO, ali on nije ispoljavao uticaj na reakcije fagocitoze i ROS u kontrolnim testovima te se, kao takav, smatra neutralnim. Međutim, postavlja se pitanje efekta etarskih ulja na mehanizam fagocitoze, zbog smanjenog procenta aktiviranih ćelija u smislu fagocitoze, ali solidnih reakcija nakon ingestije EU (posmatrajući intenzitet reakcije). Slični efekti su zabeleženi i kod ROS reakcije. Ovo može da ukaže na moguć problem ingestije/ostvarivanja kontakta sa ovim rastvorima, njegove internalizacije, odnosno, potrebe iznalaženja drugih

nosača koji bi imali bolju mogućnost prepoznavanja i usvajanja od strane neutrofilnih granulocita. U svakom slučaju, mehanizam delovanja EU nije još uvek dovoljno upoznat.

Etarska ulja verovatno nemaju uticaj na dalje povećanje fiziološki visokih vrednosti za procenat aktiviranih neutrofilnih granulocita u procesu fagocitoze (nije dokazana statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima). Istovremeno se primećuje trend smanjenja (niže numeričke vrednosti), odnosno, inhibitorno dejstvo, kako u ogledu nedelju dana pre teljenja, tako i u ogledu nedelju dana nakon teljenja. Timijan je imao (numerički posmatrano), najniže vrednosti procenta aktiviranih neutrofilnih granulocita koji su ispoljili sposobnost fagocitoze, a Armenicum[®] najviše vrednosti (približne kontroli).

Nasuprot ovome, kod ROS reakcije, pogotovo nakon teljenja, kada je produkcija metabolita kiseonika u neutrofilnim granulocitima fiziološki oslabljena, postoje indicije da timijan (u koncentraciji T4 - 0,0125% timijan) i Armenicum[®] (koncentracije A4 (1:800) i A5 (1:1600) mogu delovati stimulatorno na ROS produkciju, povećavajući procenat aktiviranih neutrofilnih granulocita kao i intenzitet ROS reakcije. To povećanje je bilo veće za 25% u odnosu na kontrolnu grupu, ali usled velikih individualnih oscilacija i malog broja analiziranih jedinki nije utvrđena statistički značajna razlika u srednjim vrednostima.

Poređenjem uticaja različitih tretmana na intenzitet fagocitoze od strane neutrofilnih granulocita, pre i posle teljenja, ustanovljene su statistički značajno veće vrednosti ($p < 0,05$), pri tretmanu A5 (1:1600) nakon teljenja. Korelacije uticaja tretmana A5 (1:1600), A4 (1:800) i T4 (0,0125% timijan), na intenzitet i indeks ROS reakcije, pre i posle teljenja, ukazale su na statistički značajno veće vrednosti nakon teljenja ($p < 0,05$).

Potrebna su dodatna ispitivanja da bi se jasnije definisao uticaj etarskih ulja i to a) proširenjem spektra ispitujućih koncentracija korišćenih EU i Armenicum-a[®]; b) korišćenjem minimalnih koncentracija stimulatora ROS reakcije (PMA), koji bi imali zadatak samo da pokrenu (podstaknu) prasak, a da EU "dopune" reakciju, ne dostižući maksimalne fiziološke vrednosti koje se dobijaju pristupom koji je korišćen u našoj studiji i c) sprovođenjem ogleda i u prvoj i u drugoj nedelji nakon teljenja, kada su životinje imunološki kompromitovane u izvesnoj meri.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih određivanjem metaboličkog, hematološkog profila i funkcionalne sposobnosti neutrofilnih granulocita iz pune krvi krava u peripartalnom periodu i to tri nedelje pre i četiri nedelje posle teljenja, kao i rezultata dobijenih ispitivanjem uticaja egzogenih faktora na funkcionalnu sposobnost neutrofilnih granulocita iz pune krvi krava u nedelji pre i nedelji posle teljenja, mogu se formulisati sledeći zaključci:

1. Aktivnost neutrofilnih granulocita prati fiziološke potrebe organizma, pojačavajući aktivnost u kritičnom periodu nakon teljenja.
2. Procenat aktiviranih ćelija koje su izvršile fagocitozu ukazuje na konstantan porast aktivnosti neutrofilnih granulocita u periodu pre teljenja i statistički značajno višu aktivnost u postpartalnom periodu.
3. Procenat ćelija koje su pokazale aktivnost respiratornog praska raste u periodu do teljenja, a zatim sledi pad (posmatrajući numeričke vrednosti).
4. Posmatranjem dinamične promene intenziteta i indeksa fagocitoze, kao intenziteta respiratornog praska neutrofilnih granulocita (u odnosu na vreme teljenja), može se zaključiti da je odbrambeni status bio povoljan i da se ukupni kapacitet (broj fagocitovanih bakterija i intenzitet fagocitoze) znatno pojačava neposredno nakon teljenja i sa odmicanjem laktacije.
5. Postpartalne koncentracije BHB i NEMK iako su statistički značajno veće ($p < 0,01$) su bile u fiziološkim granicama u posmatranom periodu i pogodovali su aktivaciji neutrofilnih granulocita.
6. Uočene statistički značajne razlike u aktivnosti ALT, AST i koncentracijama bilirubina nakon teljenja, u odnosu na vrednosti pre teljenja, ukazuju samo na intenzivnije metaboličke procese.
7. Zdravstvenih poremećaja u čijoj osnovi leži poremećaj metabolizma ispitivanih minerala nije bilo, tako da statistički značajne razlike u srednjim vrednostima Ca, Mg i P u krvnom serumu, koje su utvrđene među pojedinim terminima uzorkovanja, ukazuju na aktivne homeostatske mehanizme.

8. Tretman pune krvi različitim koncentracijama etarskih ulja nije uticao na fagocitnu sposobnost neutrofilnih granulocita. Nijedno od etarskih ulja u primenjenoj koncentraciji, nije uticalo na dalje povećanje fiziološki visokih vrednosti procenta aktiviranih neutrofilnih granulocita u procesu fagocitoze, kao ni ukupnog kapaciteta (broj fagocitovanih bakterija i intenziteta fagocitoze).

9. Uočen je inhibitorni uticaj i etarskih ulja i Armenicum®-a na procenat aktiviranih neutrofilnih granulocita koji su ispoljili sposobnost fagocitoze, kako u periodu nedelju dana pre teljenja, tako i u periodu nedelju dana nakon teljenja. Najizraženije inhibitorno dejstvo je imao timijan na vrednost procenta aktiviranih neutrofilnih granulocita koji su ispoljili sposobnost fagocitoze, a Armenicum® najmanje izraženo inhibitorno dejstvo (vrednosti približne kontroli).

10. Nakon teljenja, kada je oslabljena aktivnost respiratornog praska neutrofilnih granulocita, uočeno je stimulatívno dejstvo i etarskih ulja i Armenicum®-a, ne samo na povećanje broja neutrofilnih granulocita koji su ispoljili respiratorni prasak, već i na pojačavanje intenziteta ove reakcije, a samim tim i indeksa respiratornog praska.

11. Nakon teljenja, kada je produkcija metabolita kiseonika u neutrofilnim granulocitima fiziološki oslabljena - menta (u koncentraciji M1 - 0,1% menta), timijan (u koncentraciji T4 - 0,0125% timijan) i Armenicum® (koncentracije A4 (1:800) i A5 (1:1600)) su pozitivno uticali i na intenzitet i na indeks respiratornog praska neutrofilnih granulocita.

8. SPISAK LITERATURE

1. Abasali H, Mohamad S, 2010, Immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with herbal immunostimulants diets, *J Animal Veterinary Adv*, 9, 13, 1839-47.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, 1994, *Cellular and molecular immunology*, 2nd ed, Elsevier Health Sciences.
3. Abed RM, 2011, Cytotoxic, cytogenetics and immunomodulatory effects of thymol from *Thymus vulgaris* on cancer and normal cell lines in vitro and in vivo, *Al-Mustansiriyah J Sci*, 22, 5, 41-53.
4. Adel M, Safari R, Pourgholam R, Zorriehzakra J, Esteban MÁ, 2015, Dietary peppermint (*Mentha piperita*) extracts promote growth performance and increase the main humoral immune parameters (both at mucosal and systemic level) of Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1877), *Fish Shellfish Immunol*, 47, 1, 623-9.
5. Adewuyi AA, Gruys E, Van Eerdenburg FJ, 2005, Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle, *Vet Q*, 27, 3, 117-26.
6. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walte P, 2002, *B Cells and Antibodies In: Molecular Biology of the Cell*, 4th edition, New York, Garland Science.
7. Aleri JW, Hine BC, Pymana MF, Mansell PD, Wales WJ, Mallarde B *et al*, 2016, Periparturient immunosuppression and strategies to improve dairy cow health during the periparturient period, *Res Vet Sci*, 108, 8-17.
8. Amirghofran Z, Ahmadi H, Karimi MH, 2012, Immunomodulatory activity of the water extract of *Thymus vulgaris*, *Thymus daenensis* and *Zataria multiflora* on dendritic cells and T cells responses, *J Immunoassay Immunochem*, 33, 4, 388-402.
9. Amirghofran Z, Hashemzadeh R, Javidnia K, Golmoghaddam H, Esmaeilbeig A, 2011, In vitro immunomodulatory effects of extracts from three plants of the *Labiatae* family and isolation of the active compound(s), *J Immunotoxicol*, 8, 4, 265-73.
10. Andreasen CB, Roth JA, 2000, Neutrophil functional abnormalities, *Schalm's Veterinary Hematology*, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, 356-65.
11. Aschenbach JR, Kristensen NB, Donkin SS, Hammon HM, Penner GB, 2010, Gluconeogenesis in Dairy Cows: The Secret of Making Sweet Milk from Sour Dough, *Life*, 62, 12, 869-77.
12. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M, 2008, Biological effects of essential oils- a review, *Food Chem Toxicol*, 46, 2, 446-75.
13. Bauman DE, Currie WB, 1980, Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis, *J Dairy Sci*, 63, 9, 1514-29.
14. Belić B, Cincović MR, Davidov I, Lako B, Potkonjak A, Stančić I, 2012, Periparturient hematological finding in dairy cows with uterus and udder inflammation, *Contemporary agriculture*, 61, 1-2, 112-8.
15. Bell AW, 1995, Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation, *J Anim Sci*, 73, 9, 2804-19.
16. Bell AW, Burhans WS, Overton TR, 2000, Protein nutrition in late pregnancy, maternal protein reserves and lactation performance in dairy cows, *Proc Nutr Soc*, 59, 1, 119-26.

17. Benchaar C, Calsamiglia S, Chaves AV, Fraser GR, Colombatto D, McAllister TA *et al*, 2008, A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production, *Anim Feed Sci Technol*, 145, 1-4, 209-28.
18. Bertoni G, Trevisi E, Han X, Bionaz M, 2008, Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows, *J Dairy Sci*, 91, 9, 3300-10.
19. Beurel E, Michalek SM, Jope RS, 2010, Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3), *Trends Immunol*, 31, 1, 24-31.
20. Bicalho ML, Marques EC, Gilbert RO, Bicalho RC, 2017, The association of plasma glucose, BHBA and NEFA with postpartum uterine diseases, fertility, and milk production of Holstein dairy cows, *Theriogenology*, 88, 270-82.
21. Bionaz M, Trevisi E, Calamari L, Librandi F, Ferrari A, Bertoni G, 2007, Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows, *J Dairy Sci*, 90, 4, 1740-50.
22. Björkman L, Dahlgren C, Karlsson A, Brown KL, Bylund J, 2008, Phagocyte-derived reactive oxygen species as suppressors of inflammatory disease, *Arthritis Rheum*, 58, 10, 2931-5.
23. Bobe G, Young JW, Beitz DC, 2004, Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows, *J Dairy Sci*, 87, 10, 3105-24.
24. Borregaard N, 2010, Neutrophils, from marrow to microbes, *Immunity*, 33, 5, 657-70.
25. Boyle AR, Ferris CP, O'Connell NE, 2013, Does housing nulliparous dairy cows with multiparous animals prior to calving influence welfare- and production-related parameters after calving? *Appl Anim Behav Sci*, 143, 1, 1-8.
26. Božin B, Mimica-Dukić N, Simin N, Anackov G, 2006, Characterization of the volatile composition of essential oils of some *Lamiaceae* spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils, *J Agr Food*, 54, 5, 1822-8.
27. Breukink HJ, Wensing TH, 1997, Pathophysiology of the liver in high yielding cows and its consequences for health and production, *Isr J Vet Med*, 52, 66-72.
28. Brinkmann V, Zychlinsky A, 2012, Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin?, *J Cell Biol*, 198, 5, 773-83.
29. Bukovská A, Cikoš Š, Juhás Š, Il'ková G, Reháč P, Koppel J, 2007, Effects of a combination of thyme and oregano essential oils on TNBS-induced colitis in mice, *Mediat Inflamm*, 2007, 1-9.
30. Burvenich C, Paape MJ, Hill AW, Guidry AJ, Miller RH, Heyneman R *et al*, 1994, Role of the neutrophil leucocyte in the local and systemic reactions during experimentally induced *E. coli* mastitis in cows immediately after calving, *Vet Q*, 16, 1, 45-50.
31. Butcher CE, Picker JL, 1996, Lymphocyte homing and homeostasis, *Science*, New Series, 272, 60-6.
32. Cai TQ, Weston PG, Lund LA, Brodie B, Mekenna DJ, Wagner WC, 1994, Association between neutrophil function and periparturient disorders in cows, *Am J Vet Res*, 55, 7, 934-43.
33. Caswell JL, 2014, Failure of respiratory defenses in the pathogenesis of bacterial pneumonia of cattle, *Vet Pathol*, 51, 2, 393-409.
34. Chapinal N, LeBlanc SJ, Carson ME, Leslie KE, Godde S, Capel M *et al*, 2012, Herd-level association of serum metabolites in the transition period with disease, milk production, and early lactation reproductive performance, *J Dairy Sci*, 95, 10, 5676-82.
35. Chauhan AK, Jakhar R, Paul S, Kang SC, 2014, Potentiation of macrophage activity by thymol through augmenting phagocytosis, *Int Immunopharmacol*, 18, 2, 340-6.

36. Chrpova D, Kouřimská L, Gordon MH, Heřmanová V, Roubíčková I, Panek J, 2010, Antioxidant activity of selected phenols and herbs used in diets for medical conditions, *Czech J Food Sci*, 28, 4, 317-25.
37. Contreras GA, Sordillo LM, 2011, Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows, *Comp Immunol Microb*, 34, 3, 281-9.
38. Contreras GA, Strieder-Barboza C, Raphael W, 2017, Adipose tissue lipolysis and remodeling during the transition period of dairy cows, *J Anim Sci Biotechno*, 8, 41, doi: 10.1186/s40104-017-0174-4.
39. Cosentino M, Bombelli R, Conti A, Colombo ML, Azzetti A, Bergamaschi A *et al*, 2009, Antioxidant properties and *in vitro* immunomodulatory effects of peppermint (*Mentha x piperita L.*) essential oils in human leukocytes, *J Pharm Sci Res*, 1, 3, 33-43.
40. Cosentino M, Luini A, Bombelli R, Corasaniti MT, Bagetta G, Marino F, 2014, The essential oil of bergamot stimulates reactive oxygen species production in human polymorphonuclear leukocytes, *Phytother Res*, 28, 8, 1232-9.
41. da Silva Ramos R, Rodrigues A, Farias A, Simões RC, Pinheiro MT, Ferreira RM *et al*, 2017, Chemical composition and *in vitro* antioxidant, cytotoxic, antimicrobial, and larvicidal activities of the essential oil of *Mentha piperita L. (Lamiaceae)*, *Sci World J*, 2017, doi:10.1155/2017/4927214.
42. Dahlgren C, Karlsson A, 1999, Respiratory burst in human neutrophils, *J Immunol Methods*, 232, 3-14.
43. Davtyan TK, Hakobyan IS, Manukyan HA, Avelisyan SA, Gabrielyan ES, 2004, Phagocytosis and oxidative burst down-modulation by potent microbicide lithium-iodophore, *J Nat Sci*, 2, 22-30.
44. Davtyan TK, Hakobyan IS, Muradyan RE, Hovhannisyan HG, Gabrielyan ES, 2007, Evaluation of amino acids as mediators for the antibacterial activity of iodine-lithium- α -dextrin *in vitro* and *in vivo*, *J Antimicrob Chemoth*, 59, 6, 1114-22.
45. Davtyan TK, Mkhitarian LM, Gabrielyan ES, 2009, Design of iodine-lithium- α -dextrin liquid crystal with potent antimicrobial and anti-inflammatory properties, *Curr Pharm Design*, 15, 11, 1172-86.
46. Đoković R, Ilić Z, Kurčubić V, Jevtić S, 2009, The functional state of liver cells in dairy cows during transition and lactation, *Acta agric Serb*, 14, 27, 53-61.
47. Đoković RD, Kurčubić VS, Ilić ZZ, 2014, Blood serum levels of macro- and micronutrients in transition and full lactation cows, *Bulg J Agric Sci*, 20, 715-20.
48. Drackley JK, Dann HM, Douglas N, Janovick Guretzky NA, Litherland NB, Underwood JP *et al*, 2005, Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders, *Ital J Anim Sci*, 4, 323-44.
49. Drackley JK, Overton TR, Douglas GN, 2001, Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period, *J Dairy Sci*, 84, E100-12.
50. Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster G, 1989, A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows, *J Dairy Sci*, 72, 68-78.
51. El Tawab AMA, Shahin NN, Abdel Mohsen MM, 2014, Protective effect of *Satureja montana* extract on cyclophosphamide-induced testicular injury in rats, *Chem-Biol Interact*, 224, 196-205.
52. Elbim C, Lizard G., 2009, Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations, *Cytometry Part A*, 75(6), 475-481.
53. Emeish WF, El-deen AGS, 2016, Immunomodulatory effects of thyme and fenugreek in sharptooth catfish, *Clarias Gariepinus*, *Assiut Vet Med J*, 62, 150, 1-7.

54. European Pharmacopoeia, 7th edition., vol. 1. Strasbourg: Council of Europe, 2010.??
55. Fachini-Queiroz FC, Kummer R, Estevao-Silva CF, Carvalho MD, Cunha JM, Grespan R *et al*, 2012, Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response, Evid-based Complement Alternat Med, 2012, 1-10, doi: [10.1155/2012/657026](https://doi.org/10.1155/2012/657026).
56. Falcone H, Franco HH, Gibbs FB, 2000, The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses, Blood, 96, 13, 4028-38.
57. Faurischou M, Borregaard N, 2003, Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation, Microbes Infect, 5, 1317-27.
58. Fearon TD, Locksley MR, 1996, The instructive role of innate immunity in the acquired immune response, Science, New Series, 272, 5258, 50-4.
59. Fiore E, Piccione G, Arfuso F, Zumbo A, Gianesella M, 2017, Metabolic changes in dairy cows at different lactation class during the transition period, Large Anim Rev, 23, 2, 45-8.
60. Flannagan RS, Cosío G, Grinstein S, 2009, Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies, Nat Rev Microbiol, 7, 5, 355-66.
61. Fox S, Leitch EA, Duffin R, Haslett C, Rossi GA, 2010, Neutrophil Apoptosis: Relevance To The Innate Immune Response And Inflammatory Disease, J Innate Immun, 2, 216-27.
62. Franzios G, Mirotsoy M, Hatziapostolou E, Kral J, Scouras ZG, Mavragani-Tsipidou P, 1997, Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils, J Agr Food Chem, 45, 2690-4.
63. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V *et al*, 2007, Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. J Cell Biol, 176, 2, 231-41.
64. Gabbianelli R, Falcioni ML, Nasuti C, Cantalamessa F, Imada I, Inoue M, 2009, Effect of permethrin insecticide on rat polymorphonuclear neutrophils, Chem Biol Interact, 182, 2-3, 245-52.
65. Galvão KN, Flaminio MJ, Brittin SB, Sper R, Fraga, M, Caixeta L *et al*, 2010, Association between uterine disease and indicators of neutrophil and systemic energy status in lactating Holstein cows, J Dairy Sci, 93, 7, 2926-37.
66. Galvão KN, Santos JEP, 2014, Recent advances in the immunology and uterine microbiology of healthy cows and cows that develop uterine disease, Turk J Vet Anim Sci, 38, 577-88.
67. Gandra JR, Barletta RV, Mingoti RD, Verdurico LC, Freitas JE, Oliveira LJ *et al*, 2016, Effects of whole flaxseed, raw soybeans, and calcium salts of fatty acids on measures of cellular immune function of transition dairy cows, J Dairy Sci, 99, 6, 4590-606.
68. Găvan C, Retea C, Motorga V, 2010, Changes in the hematological profile of Holstein primiparous in periparturient period and in early to mid-lactation, Sci P J Anim Sci Biotechno, 43, 2, 244-6.
69. Georgopoulos K, 2002, Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros, Nat Rev Immunol, 2, 3, 162-74.
70. Gilbert RO, Gröhn YT, Miller PM, Hoffman DJ, 1993, Effect of parity on periparturient neutrophil function in dairy cows, Vet Immunol Immunop, 36, 1, 75-82.
71. Goff JP, 2000, Pathophysiology of calcium and phosphorus disorders, Vet Clin North Am Food Anim Pract, 16, 2, 319-37.
72. Goff JP, 2006, Macromineral physiology and application to the feeding of the dairy cow for prevention of milk fever and other periparturient mineral disorders, Anim Feed Sci Tech, 126, 3-4, 237-57.

73. Goff JP, 2008, Transition cow immune function and interaction with metabolic diseases, In Proc. 17th Annu. Tri-State Dairy Nutr. Conf. The Ohio State University, Columbus, 45-57.
74. Goff JP, Horst RL, 1997, Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders, *J Dairy Sci*, 80, 7, 1260-8.
75. Graugnard DE, Bionaz M, Trevisi ER, Moyes KM, Salak-Johnson JL, Wallace RL *et al*, 2012, Blood immunometabolic indices and polymorphonuclear neutrophil function in peripartum dairy cows are altered by level of dietary energy prepartum, *J Dairy Sci*, 95, 4, 1749-58.
76. Guidry AJ, Paape MJ, Pearson RE, 1976, Effects of parturition and lactation on blood and milk cell concentrations, corticosteroids, and neutrophil phagocytosis in the cow, *Am J Vet Res*, 37, 1195.
77. Haddad PS, Azar GA, Groom S, Boivin M, 2005, Natural health products, modulation of immune function and prevention of chronic diseases, *Evid-Based Compl Alt*, 2, 4, 513-20.
78. Hammon DS, Evjen IM, Dhiman TR, Goff JP, Walters JL, 2006, Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders, *Vet Immuno Immunop*, 113, 21-9.
79. Hayirli A, Keisler DH, Doepel L, 2011, Peripartum responses of dairy cows to prepartal feeding level and dietary fatty acid source, *J Dairy Sci*, 94, 2, 917-30.
80. Hernández-Castellano LE, Hernandez LL, Sauerwein H, Bruckmaier RM, 2017, Endocrine and metabolic changes in transition dairy cows are affected by prepartum infusions of a serotonin precursor, *J Dairy Sci*, 100, 6, 5050-57.
81. Hernández-Castellano LE, Weaver SR, Hernandez LL, Bruckmaier RM, 2017, Increased serum serotonin improves parturient calcium homeostasis in dairy cows, *J Dairy Sci*, 100, 1580-7.
82. Hoebe K, Janssen E, Beutler B, 2004, The interface between innate and adaptive immunity, *Nat immunol*, 5, 10, 971-4.
83. Hoeben D, Burvenich C, Massart-Leëen AM, Lenjou M, Nijs G, Van Bockstaele D *et al*, 1999, *In vitro* effect of ketone bodies, glucocorticosteroids and bovine pregnancy-associated glycoprotein on cultures of bone marrow progenitor cells of cows and calves, *Vet Immunol Immunop*, 68, 2-4, 229-40.
84. Hoeben D, Heyneman R, Burvenich C, 1997, Elevated levels of β -hydroxybutyric acid in periparturient cows and *in vitro* effect on respiratory burst activity of bovine neutrophils, *Vet Immunol Immunop*, 58, 2, 165-70.
85. Hoedemaker M, Lund LA, Wagner WC, 1992, Function of neutrophils and chemoattractant properties of fetal placental tissue during the last month of pregnancy in cows, *Am J Vet Res*, 53, 1524-9.
86. Hoet S, Stevigny C, Herent MF, Quetin-Leclercq J, 2006, Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinose*, *Planta Med*, 72, 480-2.
87. Holtenius P, 1993, Hormonal regulation related to the development of fatty liver and ketosis, *Acta Vet Scand, Suppl*, 89, 55-60.
88. Holtenius P, Holtenius K, 1996, New aspects of ketone bodies in energy metabolism in dairy cows, *J Vet Med A*, 43, 579-87.
89. Horvat J, Jovanovic M, 1999, The concentration of total bilirubin and activity of AST, ALT, GLDH, CPK and AP in the blood of cows before and after calving, *Acta Vet-Beograd*, 49, 2-3, 127-38.

90. Hosoda K, Nishida T, Park WY, Eruden B, 2005, Influence of *Mentha x piperita* L. (peppermint) supplementation on nutrient digestibility and energy metabolism in lactating dairy cows, *Asian-Aust J Anim Sci*, 18, 1721-6.
91. Hu S, Cai W, Ye J, Qian Z, Sun Z, 1992, Influence of medicinal herbs on phagocytosis by bovine neutrophils, *J Vet Med A*, 39, 1-10, 593-9.
92. Hussain AM, Daniel RCW, 1991, Studies on Some Aspects of Neutrophil Functions and Uterine Defenses in Cows during the Estrous Cycle, 26, 6, 290-6.
93. Huzzey JM, Mann S, Nydam DV, Grant RJ, Overton TR, 2015, Associations of peripartum markers of stress and inflammation with milk yield and reproductive performance in Holstei dairy cows, *Prev Vet Med*, 120, 3, 291-7.
94. Iba T, Hashiguchi N, Nagaoka I, Tabe Y, Murai M, 2013, Neutrophil cell death in response to infection and its relation to coagulation, *J Intensive Care*, 1, 1, 13, 1-10.
95. Ingvarsen KL, Moyes KM, 2015, Factors contributing to immunosuppression in the dairy cow during the periparturient period, *Jpn J Vet Res*, 63, S15-24.
96. Issi M, Gül Y, Başbuğ O, 2016, Evaluation of renal and hepatic functions in cattle with subclinical and clinical ketosis, *Turk J Vet Anim Sci*, 40, 1, 47-52.
97. Jazbec I, 1990, Kliničko laboratorijska dijagnostika, *Universa v Ljubljani, Veterinarska fakulteta*.
98. Kadzere CT, Murphy MR, Silanikove N, Maltz E, 2002, Heat stress in lactating dairy cows: a review, *Livest Sci*, 77, 1, 59-91.
99. Kahn CM, Line S, 2005, *The merck veterinary manual*, 9th edition, Merck Sharp & Dohme Corp., A subsidiary of Merck & Co. Inc., NJ, USA.
100. Kaufmann TB, Drillich M, Tenhagen BA, Heuwieser W, 2010, Correlations between periparturient serum concentrations of non-esterified fatty acids, beta-hydroxybutyric acid, bilirubin, and urea and the occurrence of clinical and subclinical postpartum bovine endometritis, *BMC Vet Res*, 6, 1, 47, 1-6.
101. Kehrlı ME, 2015, Immunological dysfunction in periparturient cows: evidence, causes and ramifications, In *Proc Florida Nutr Conf*, 14-29.
102. Kehrlı ME, Goff JP, 1989a, Periparturient hypocalcemia in cows: effects on peripheral blood neutrophil and lymphocyte function, *J Dairy Sci*, 72, 5, 1188-96.
103. Kehrlı ME, Nonnecke BJ Jr, Roth JA, 1989b, Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period, *Am J Vet Res*, 1989, 50, 2, 207-14.;
104. Kettle JA, Gedye AC, Winterbourn CC, 1997, Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzoic acid hydrazide, *Biochem J*, 321, 503-8.
105. Kimura K, Goff JP, Canning P, Wang C, Roth JA, 2014, Effect of recombinant bovine granulocyte colony-stimulating factor covalently bound to polyethylene glycol injection on neutrophil number and function in periparturient dairy cows, *J Dairy Sci*, 97, 8, 4842-51.
106. Kovačević Mira, Funkcionalno stanje jetre i hormonalni status krava različite uhranjenosti u graviditetu i ranoj laktaciji, *Doktorska disertacija, Beograd, 2000*.
107. Kovács M, Tuboly T, Mézes M, Balogh K, Gerencsér Z, Matics Z et al, 2016, Effect of dietary supplementation of spirulina (*Arthrospira Platensis*) and thyme (*Thymus Vulgaris*) on serum biochemistry, immune response and antioxidant status of rabbits, *Ann Anim Sci*, 16, 1, 181-95.
108. Kozłowska M, Laudy AE, Przybył J, Ziarno M, Majewska E, 2015, Chemical composition and antibacterial activity of some medicinal plants from *Lamiaceae* family, *Acta Pol Pharm*, 72, 4, 757-67.

109. Krsmanović M, Djoković R, Giadinis ND, Panousis N, Bojkovski D, Savić-Stevanović V *et al*, 2015, Determination of macroelement parameters in different productive stages of Simmental cows, *Isr J Vet Med*, 70, 1, 12-5.
110. Kumar V, Sharma A, 2010, Neutrophils: Cinderella of innate immune system, *Int Immunopharmacol*, 10, 11, 1325-34.
111. Kummer R, Fachini-Queiroz FC, Estevão-Silva CF, Grespan R, Silva EL, Bersani-Amado CA *et al*, 2013, Evaluation of anti-inflammatory activity of *Citrus latifolia Tanaka* essential oil and limonene in experimental mouse models, *Evid-Based Compl Alt*, 2013, 1-8, doi: [10.1155/2013/859083](https://doi.org/10.1155/2013/859083).
112. Kung L, Williams P, Schmidt RJ, Hu WA, 2008, Blend of essential plant oils used as an additive to alter silage fermentation or used as a feed additive for lactating dairy cows, *J Dairy Sci*, 91, 4793–800.
113. Laven RA, Wathes DC, Lawrence KE, Scaramuzzi RJ, 2007, An analysis of the relationship between plasma urea and ammonia concentration in dairy cattle fed a consistent diet over a 100-day period, *J Dairy Res*, 74, 4, 412-6.
114. Lazarevic M, Spring P, Shabanovic M, Tokic V, Tucker AL, 2010, Effect of gut active carbohydrates on plasma IgG concentrations in piglets and calves, *Animal*, 4, 6, 438-43, doi: [10.1017/S1751731110000194](https://doi.org/10.1017/S1751731110000194)
115. LeBlanc S, 2010, Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period, *J Reprod Develop*, 56, S29-35.
116. Lee SJ, Umamo K, Shibamoto T, Lee KG, 2005, Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties, *Food Chem*, 91, 1, 131-7.
117. Lieb J, 2004, The immunostimulating and antimicrobial properties of lithium and antidepressants, *J Infection*, 49, 2, 88-93.
118. Linden M, Westerlaken GH, Vlist M, Montfrans J, Meyaard L, 2017, Differential signalling and kinetics of neutrophil extracellular trap release revealed by quantitative live imaging, *Sci rep*, 7, 1, 6529.
119. Madsen SA, Weber PS, Burton JL, 2002, Altered expression of cellular genes in neutrophils of periparturient dairy cows, *Vet Immunol Immunopathol*, 86, 3-4, 159-175.
120. Mallard BA, Dekkers JC, Ireland MJ, Leslie KE, Sharif S, Vankampen CL *et al*, 1998, Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health, *J Dairy Sci*, 81, 2, 585-95.
121. Marai i sar. (1997) Marai IFM, Habeeb AAM, Farghaly HM, 1999, Productive, physiological and biochemical changes in imported and locally born Friesian and Holstein lactating cows under hot summer conditions of Egypt, *Trop Anim Health Prod*, 31, 4, 233-43.
122. Marin M, Novaković M, Tešević V, Vučković I, Milojević N, Vuković-Gačić *et al*, 2012, Antioxidative, antibacterial and antifungal activity of the essential oil of wild-growing *Satureja montana* L from Dalmatia, Croatia, *Flavour Frag J*, 27, 3, 216-23.
123. Martinez N, Risco CA, Lima FS, Bisinotto RS, Greco LF, Ribeiro ES, *et al*, 2012, Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease, *J Dairy Sci* 95, 12, 7158-72.
124. Mateus L, Lopes da Costa L, Carvalho H, Serra P, Silva R, 2002, Blood and intrauterine leukocyte profile and function in dairy cows that spontaneously recovered from postpartum endometritis, *Reprod Domest Anim*, 37, 176-80

125. McCarthy MM, Mann S, Nydam DV, Overton TR, McArt JA, 2015, Concentrations of nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate in dairy cows are not well correlated during the transition period, *J Dairy Sci*, 98, 9, 6284-90.
126. McDougall S, LeBlanc SJ, Heiser A, 2017, Effect of prepartum energy balance on neutrophil function following pegbovigrastim treatment in periparturient cows, *J Dairy Sci*, 100, 9, 7478-92.
127. Meglia GE, Johannisson A, Agenäs S, Holtenius K, Waller KP, 2005, Effects of feeding intensity during the dry period on leukocyte and lymphocyte sub-populations, neutrophil function and health in periparturient dairy cows, *Vet J*, 169, 3, 376-84.
128. Miguel MG, 2010, Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review, *Molecules*, 15, 12, 9252-87.
129. Miles K, Clarke JD, Lu W, Sibinska Z, Beaumont EP, Davidson DJ, *et al*, 2009, Dying and necrotic neutrophils are anti-inflammatory secondary to the release of α -defensins, *J Immunol*, 183, 3, 2122-32.
130. Milovanović A, 2014, Ispitivanje uticaja funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita i progesteronskog profila na razvoj poremećaja u reprodukciji krava, doktorska disertacija, Beograd, Fakultet veterinarske medicine, Katedra za fiziologiju i biohemiju, 237 str.
131. Milovanović A, Jovičin M, Šamanc H, 2005, Ocenjivanje telesne kondicije krava Holštajn-frizijske rase, Veterinarska komora Srbije, Beograd.
132. Mitchell GB, Albright BN, Caswell JL, 2003, Effect of interleukin-8 and granulocyte colony-stimulating factor on priming and activation of bovine neutrophils, *Infect Immun*, 71, 4, 1643-9.
133. Mogosan C, Vostinaru O, Oprean R, Heghes C, Filip L, Balica G *et al*, 2017, A comparative analysis of the chemical composition, anti-inflammatory, and antinociceptive effects of the essential oils from three species of *Mentha* cultivated in Romania, *Molecules*, 22, 2, 263, 1-11, doi: [10.3390/molecules22020263](https://doi.org/10.3390/molecules22020263).
134. Mohri M, Sharifi K, Eidi S, 2007, Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: age related changes and comparison with blood composition in adults, *Res Vet Sci*, 83, 1, 30-9.
135. Mordak R, Stewart PA, 2015, Periparturient stress and immune suppression as a potential cause of retained placenta in highly productive dairy cows: examples of prevention, *Acta Vet Scand*, 57, 84, 1-8, doi: [10.1186/s13028-015-0175-2](https://doi.org/10.1186/s13028-015-0175-2).
136. Moreira da Silva, Burvenich FC, Massart Lee, L Brosse AM, 1998, Assessment of blood neutrophil oxidative burst activity in dairy cows during the period of parturition, *Anim Sci* 67, 421-6.
137. Moretti P, Probo M, Cantoni A, Paltrinieri S, Giordano A, 2016, Fluctuation of neutrophil counts around parturition in Holstein dairy cows with and without retained placenta, *Res Vet Sci*, 107, 207-12.
138. Moya SL, Gómez MA, Boyle LA, Mee JF, O'Brien B, Arkins S, 2008, Effects of milking frequency on phagocytosis and oxidative burst activity of phagocytes from primiparous and multiparous dairy cows during early lactation, *J Dairy Sci*, 91, 2, 587-95.
139. Nauseef WM, Clark RA, 2000, Granulocytic phagocytes, Principles and practice of infectious diseases, 93-117.
140. Nazhat SA, Kitahara G, Kozuka N, Mido S, Sadawy M, Ali H *et al*, 2018, Associations of periparturient plasma biochemical parameters, endometrial leukocyte esterase and myeloperoxidase, and bacterial detection with clinical and subclinical endometritis in postpartum dairy cows, *J Vet Med Sci*, 80, 2, 302-10.

141. Newbould FH, 1976, Phagocytic activity of bovine leukocytes during pregnancy, *Can J Comp Med*, 40, 1, 111.
142. Nikolić JA, Kulcsár M, Kátai L, Nedić O, Jánosi S, Huszenicza G, 2003, Periparturient endocrine and metabolic changes in healthy cows and in cows affected by mastitis, *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 50, 1, 22-9.
143. Nunes P, Demarex N, 2010, The role of calcium signaling in phagocytosis, *J leukocyte boil*, 88, 1, 57-68.
144. Oh J, Giallongo F, Frederick T, Pate J, Walusimbi S, Elias RJ *et al*, 2015, Effects of dietary capsicum oleoresin on productivity and immune responses in lactating dairy cows, *J Dairy Sci*, 98, 6327–39.
145. Oh J, Hristov AN, 2016, Effects of plant-derived bio-active compounds on rumen fermentation, nutrient utilization, immune response, and productivity of ruminant animals. In *Medicinal and Aromatic Crops: Production, Phytochemistry, and Utilization*, American Chemical Society, Chapter 11, 167–86, doi: 10.1021/bk-2016-1218.ch011.
146. Oh J, Hristov AN, Lee C, Cassidy T, Heyler K, Varga GA *et al*, 2013, Immune and production responses of dairy cows to postprandial supplementation with phytonutrients, *J Dairy Sci*, 96, 7830–43.
147. Orhan IE, Mesaik, MA, Jabeen A, Kan Y, 2016, Immunomodulatory properties of various natural compounds and essential oils through modulation of human cellular immune response, *Ind Crop Prod*, 81, 117-22.
148. Orrù L, Abeni F, Catillo G, Grandoni F, Crisà A, De Matteis G *et al*, 2012, Leptin gene haplotypes are associated with change in immunological and hematological variables in dairy cow during the peripartum period, *J Anim Sci*, 90, 1, 16-26.
149. Otto KA, Ferguson JD, Fox DG, Sniffen CJ, 1991, Relationship between body condition score and composition of ninth to eleventh rib tissue in Holstein dairy cows, *J Dairy Sci*, 74:852-9.
150. Overton TR, Drackley JK, Ottemann-Abbamonte CJ, Beaulieu AD, Emmert LS, Clark JH, 1999, Substrate utilization for hepatic gluconeogenesis is altered by increased glucose demand in ruminants, *J Anim Sci* 77, 7, 1940-51.
151. Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarco'n JJ, Cajero-Jua'rez M, Ochoa-Zarzosa A, Lo'pez-Meza JE, Bravo-Patin'õ A *et al*, 2007, Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis, *J Infection* 54, 4, 399-409.
152. Paape MJ, MilleR RH, Young MD, Peters RR, 1992, Influence of involution on intramammary phagocytic defense mechanisms, *J Dairy Sci*, 75, 1849-56
153. Paape MJ, Bannerman DD, Zhao X, Lee JW, 2003, The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk, *Vet Res*, 34, 5, 597-627.
154. Palanisamy M, Napoleon RE, Selvaraju M, Krishnakumar K, Malmarugan S, Balasubramaniam GA *et al*, 2015, Effect of Intrauterine Infusion of Immunomodulators on Cytology of Uterus in Endometritis Affected Cows, *Indian Vet J*, 92, 12, 31-4.
155. Palić D, Andreasen CB, Menzel BW, Roth JA, 2005, A rapid, direct assay to measure degranulation of primary granules in neutrophils from kidney of fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820), *Fish Shellfish Immun*, 19, 3, 217-27.
156. Papayannopoulos V, Zychlinsky A, 2009, NETs: a new strategy for using old Weapons, *Trends Immunol*, 30, 11, 513-21.
157. Pennock ND, White JT, Cross EW, Cheney EE, Tamburini BA, Kedl RM, 2013, T cell responses: naive to memory and everything in between, *Adv Physiol Educ*, 37, 4, 273-83.

158. Pérez-Rosés R, Risco E, Vila R, Peñalver P, Cañigüeral S, 2016, Biological and nonbiological antioxidant activity of some essential oils, *J Agr Food Chem*, 64, 23, 4716-24.
159. Petrović SS, Ristić MS, Petrović NV, Lazić ML, Francišković M, Petrović SD, 2014, Hemijski sastav i antioksidativna aktivnost etarskog ulja *Thymus serpyllum* L, *Hem Ind*, 68, 3, 389-97.
160. Piccinini R, Binda E, Belotti M, Casirani G, Zecconi A, 2004, The evaluation of non-specific immune status of heifers in field conditions during the periparturient period, *Vet Res*, 35, 5, 539-50.
161. Piccione G, Messina V, Marafioti S, Casella S, Giannetto C, Fazio F, 2012, Changes of some haematochemical parameters in dairy cows during late gestation, postpartum, lactation and dry periods, *Vet Med Zoot*, 58, 59-64.
162. Pires JA, Delavaud C, Faulconnier Y, Pomiès D, and Chilliard Y, 2013, Effects of body condition score at calving on indicators of fat and protein mobilization of periparturient Holstein-Friesian cows, *J Dairy Sci*, 96, 6423-39.
163. Pithon-Curi TC, De Melo MP, Curi R, 2004, Glucose and glutamine utilization by rat lymphocytes, monocytes and neutrophils in culture: a comparative study, *Cell Biochem Funct*, 22, 5, 321-6.
164. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF, 2003, The changing faces of glutathione, a cellular protagonist, *Biochem Pharmacol*, 66, 1499-503.
165. Prodanović R, Kirovski D, Vujanac I, Nešić K, Janevski A, Marić J *et al*, 2013, Stereotypical behaviour at high yielding dairy cows farms- 'tongue rolling', *Vet Glas*, 67, 5-6, 349-57.
166. Provenza FD, Villalba JJ, 2010, The role of natural plant products in modulating the immune system: an adaptable approach for combating disease in grazing animals, *Small Ruminant Res*, 89, 2, 131-9.
167. Puppel K, Kuczyńska B, 2016, Metabolic profiles of cow's blood; a review, *J Sci Food Agric*, 96, 13, 4321-8.
168. Quade MJ, Roth JA, 1997, A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules, *Vet Immunol Immunop*, 58, 3-4, 239-48.
169. Quiroz-Rocha GF, LeBlanc SJ, Duffield TF, Wood D, Leslie KE, Jacobs RM, 2009, Reference limits for biochemical and hematological analytes of dairy cows one week before and one week after parturition, *Can Vet J*, 50, 4, 383-8.
170. Radkowska I, Herbut E, 2014, Hematological and biochemical blood parameters in dairy cows depending on the management system, *Anim Sci Pap Rep*, 32, 4.
171. Rainard P, Riollot C, 2006, Innate immunity of the bovine mammary gland, *Vet Res*, 37, 369-400.
172. Rinaldi M, Li RW, Bannerman DD, Daniels KM, Evoke-Clover C, Silva MV *et al*, 2010, A sentinel function for teat tissues in dairy cows: dominant innate immune response elements define early response to *E. coli* mastitis, *Funct Integr Genomics*, 10, 1, 21-38.
173. Robinson MJ, 2008, Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes, *Histochem Cell Biol*, 130, 281-97.
174. Roth JA, Frank DE, Weighner P, Weighner M, 2001, Enhancement of neutrophil function by ultrafiltered bovine whey, *J Dairy Sci*, 84, 824-9.
175. Roubies N, Panousis N, Fytianou A, Katsoulos PD, Giadinis, N, Karatzias H, 2006, Effects of age and reproductive stage on certain serum biochemical parameters of Chios sheep under Greek rearing conditions, *J Vet Med A*, 53, 6, 277-81.

176. Sakowsky T, Kuczyńska B, Puppel K, Metera E, Słoniewski K, Barszczewski J, 2012, Relationships between physiological indicators in blood, and their yield, as well as chemical composition of milk obtained from organic dairy cows, *J Sci Food Agric* 92, 14, 2905-12.
177. Salak-Johnson JL, McGlone JJ, 2007, Making sense of apparently conflicting data: Stress and immunity in swine and cattle, *J Anim Sci*, 85, E81-8.
178. Sander AK, Piechotta M, Schlamberger G, Bollwein H, Kaske M, Sipka A *et al*, 2011, *Ex vivo* phagocytic overall performance of neutrophilic granulocytes and the relation to plasma insulin-like growth factor-I concentrations in dairy cows during the transition period, *J Dairy Sci*, 94, 4, 1762-71.
179. Santana-Rios G, Orner GA, Amantana A, Provost C, Wu SY, Dashwood RH, 2001, Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the Salmonella assay, *Mutat Res*, 495, 61-74.
180. Santos MB, Robinson PH, Williams P, Losa R, 2010, Effects of addition of an essential oil complex to the diet of lactating dairy cows on whole tract digestion of nutrients and productive performance, *Anim Feed Sci Technol*, 157, 1-2, 64-71.
181. Sartorelli P, Paltrinieri S, Agnes F, 1999, Non-specific immunity and ketone bodies I: *in vitro* studies on chemotaxis and phagocytosis in ovine neutrophils, *J Vet Med A*, 46, 10, 613-9.
182. Sartorelli P, Paltrinieri S, Comazzi S, 2000, Non-specific immunity and ketone bodies II: *In vitro* studies on adherence and superoxide anion production in ovine neutrophils, *J Vet Med A*, 47, 1, 1-8.
183. Scalia D, Lacetera N, Bernabucci U, Demeyere K, Duchateau L, Burvenich C, 2006, *in vitro* effects of nonesterified fatty acids on bovine neutrophils oxidative burst and viability, *J Dairy Sci*, 89, 1, 147-54.
184. Schulz K, Frahm J, Kersten S, Meyer U, Reiche D, Sauerwein H *et al*, 2015, Effects of elevated parameters of subclinical ketosis on the immune system of dairy cows: *in vivo* and *in vitro* results, *Arch Anim Nutr*, 69, 2, 113-27.
185. Segal WA, 2005, How Neutrophils Kill Microbes, *Annu Rev Immunol*, 23, 197-223.
186. Senatore EM, Butler WR, Oltenacu PA, 1996, Relationships between energy balance and post-partum ovarian activity and fertility in first lactation dairy cows, *J Anim Sci*, 62, 17-23.
187. Sengeløv H, Kjeldsen L, Borregaard N, 1993, Control of exocytosis in early neutrophil activation, *J Immunol*, 150, 4, 1535-43.
188. Senosy WS, Izaike Y, Osawa T, 2012, Influences of metabolic traits on subclinical endometritis at different intervals postpartum in high milking cows, *Reprod Domest Anim*, 47, 4, 666-74.
189. Serafino A, Vallebona PS, Andreola, F, Zonfrillo M, Mercuri L, Federici M *et al*, 2008, Stimulatory effect of Eucalyptus essential oil on innate cell-mediated immune response, *Bmc Immunol*, 9, 17, doi:10.1186/1471-2172-9-17.
190. Serrano C, Matos O, Teixeira B, Ramos C, Neng N, Nogueira J *et al*, 2011, Antioxidant and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. extracts, *J Sci Food Agric*, 91, 9, 1554-60.
191. Sevinç M, Başoğlu A, Güzelbektas H, Boydak M, 2003, Lipid and lipoprotein levels in dairy cows with fatty liver, *Turk J Vet Anim Sci*, 27, 2, 295-9.
192. Shimada K, Jong CJ, Takahashi K, Schaffer SW, 2015, Role of ROS production and turnover in the antioxidant activity of taurine, *Adv Exp Med Biol*, 803, 581-96.

193. Silva MT, 2011, Macrophage phagocytosis of neutrophils at inflammatory/infectious foci: a cooperative mechanism in the control of infection and infectious inflammation, *J Leukocyte Biol*, 89, 5, 675-83.
194. Singh HB, Maurya A, Sadagopan S, Kesavan PK, Acharya S, Arumugam SN, 2016, Immunomodulatory and antimicrobial activity of a polyherbal composition, Panchatulasi drops, derived from essential oils of five species of basil, *Ann phytome*, 5, 2, 130-9.
195. Singh J, Sidhu SS, Dhaliwal GS, Pangaonkar GR, Nanda AS, Grewal AS, 2000, Effectiveness of lipopolysaccharide as an intrauterine immunomodulator in curing bacterial endometritis in repeat breeding cross-bred cows, *Animal Reproduction Science* 59, 159–166;
196. Smith, Perkins, Sniffen, Pearson, page 20, in *Proc. Cornell Nut. Conf.*, Georgia, USA, 1983.
197. Soehnlein O, Weber C, Lindbom L, 2009, Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function, *Trends Immunol*, 30, 11, 538-46.
198. Sordillo LM, 2014, Immune dysfunction in periparturient dairy cows: evidence, causes, and ramifications, *Cornell Nutr Conference*.
199. Sordillo LM, Aitken SL, 2009, Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle, *Vet Immunol Immunopathol*, 128, 1-3, 104-9.
200. Sørensen OE, Borregaard N, 2016, Neutrophil extracellular traps - the dark side of neutrophils, *J Clin Invest*, 126, 5, 1612-20.
201. Ster C, Loisel MC, Lacasse P, 2012, Effect of postcalving serum nonesterified fatty acids concentration on the functionality of bovine immune cells, *J Dairy Sci*, 95, 708-17.
202. Studer VA, Grummer RR, Bertics SJ, Reynolds CK, 1993, Effect of prepartum propylene glycol administration on periparturient fatty liver in dairy cows, *J Dairy Sci*, 76, 10, 2931-9.
203. Suriyasathaporn W, Heuer C, Noordhuizen-Stassen EN, Schukken YH, 2000, Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review, *Vet Res*, 31, 4, 397-412.
204. Takemori T, Kaji T, Takahashi Y, Shimoda M, Rajewsky K, 2014, Generation of memory B cells inside and outside germinal centers, *Eur J Immunol*, 44, 5, 1258-64.
205. Talpur AD, 2014, *Mentha piperita* (Peppermint) as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of *Asian seabass*, *Lates calcarifer* (Bloch) against *Vibrio harveyi* infection, *Aquaculture*, 420, 71-8.
206. Tan X, Li WW, Guo J, Zhou JY, 2012, Down-regulation of NOD1 in neutrophils of periparturient dairy cows, *Vet Immunol Immunop*, 150, 1-2, 133-9.
207. Tassoul MD, Shaver RD, 2009, Effect of a mixture of supplemental dietary plant essential oils on performance of periparturient and early lactation dairy cows, *J Dairy Sci*, 92, 4, 1734-40.
208. Tekippe JA, Tacoma R, Hristov AN, Lee C, Oh J, Heyler KS *et al*, 2013, Effect of essential oils on ruminal fermentation and lactation performance of dairy cows, *J Dairy Sci*, 96, 12, 7892-903.
209. Tennant BC, 1997, Hepatic function, In *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Fifth Edition, 327-52.
210. Tepe B, Cilkiz M, 2016, A pharmacological and phytochemical overview on Satureja, *Pharm Biol*, 54, 3, 375-412.
211. Teunissen MB, Piskin G, di Nuzzo S, Sylva-Steenland RM, de Rie MA, Bos JD, 2002, Ultraviolet B radiation induces a transient appearance of IL-4 neutrophils, which support the development of Th2 responses, *J Immunol*, 168, 8, 3732-9.

212. Thatcher WW, Santos JEP, Silvestre FT, Kim IH, Staples CR, 2010, Perspective on physiological/endocrine and nutritional factors influencing fertility in post-partum dairy cows, *Reprod Dom Anim*, 45, 2-14.
213. Tizard IR, 2000, *Veterinary Immunology: An introduction*, 7th edition, Philadelphia: W.B. Saunders Company.
214. Toghyani M, Tohidi M, Gheisari AA, Tabeidian SA, 2010, Performance, immunity, serum biochemical and hematological parameters in broiler chicks fed dietary thyme as alternative for an antibiotic growth promoter, *Afr J Biotechnol*, 9, 40, 6819-25.
215. Tornquist SJ, Rigas J, 2010, Interpretation of ruminant leukocyte responses, *Schalm's veterinary hematology*, Ames: Wiley-Blackwell, 307-13.
216. Trevisi E, Amadori M, Cogrossi S, Razzuoli E, Bertoni G, 2012, Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows, *Res Vet Sci*, 93, 2, 695-704.
217. Trevisi E, Minuti A, 2017, Assessment of the innate immune response in the periparturient cow, *Res Vet Sci*, 116, 47-54.
218. Trevisi E, Zeconi A, Cogrossi S, Razzuoli E, Grossi P, Amadori M, 2014, Strategies for reduced antibiotic usage in dairy cattle farms, *Res Vet Sci*, 96, 2, 229-33.
219. Tsunoda E, Gross JJ, Kawashima C, Bruckmaier RM, Kida K, Miyamoto A, 2017, Feed-derived volatile basic nitrogen increases reactive oxygen species production of blood leukocytes in lactating dairy cows, *Anim Sci J*, 88, 1, 125-33.
220. Uribe E, Marín D, Vega-Gálvez A, Quispe-Fuentes I, Rodríguez A, 2016, Assessment of vacuum-dried peppermint (*Mentha piperita* L.) as a source of natural antioxidants, *Food Chem*, 190, 559-65.
221. Vailati-Riboni M, Zhou Z, Jacometo CB, Minuti A, Trevisi E, Luchini DN *et al*, 2017, Supplementation with rumen-protected methionine or choline during the transition period influences whole-blood immune response in periparturient dairy cows, *J Dairy Sci*, 100, 5, 3958-68.
222. Vakili AR, Khorrami B, Mesgaran MD, Parand E, 2013, The effects of thyme and cinnamon essential oils on performance, rumen fermentation and blood metabolites in Holstein calves consuming high concentrate diet, *Asian-Australasian J Anim Sci*, 26, 7, 935-44.
223. Van Knegsel ATM, van den Brand H, Graat EAM, Dijkstra J, Jorritsma R, Decuypere E *et al*, 2007, Dietary energy source in dairy cows in early lactation: metabolites and metabolic hormones, *J Dairy Sci*, 90, 1477-85.
224. Van Saun RJ, 2016, Indicators of dairy cow transition risks: metabolic profiling revisited, *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*, 44, 2, 118-26.
225. Vasilatos i Wangsnes, 1981, Vasilatos R, Wangsness PJ, 1981, Diurnal variations in plasma insulin and growth hormone associated with two stages of lactation in high producing dairy cows. *Endocrinology*, 108, 1, 300-4.
226. Vasquez-Anon M, Bertics S, Luck M, Grummer RR, Pinheiro J, 1994, Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows, *J Dairy Sci*, 77, 1521-8.
227. Vatter DA, Lester CE, DeLeon RC, Jamison BY, Maitin V, 2013, Dietary supplementation with two *Lamiaceae* herbs-(oregano and sage) modulates innate immunity parameters in *Lumbricus terrestris*, *Pharmacogn Res*, 5, 1, 1.
228. Von Keyserlingk MA, Rushen J, de Passillé AM, Weary DM, 2009, Invited review: The welfare of dairy cattle - Key concepts and the role of science, *J Dairy Sci*, 92, 9, 4101-11.

229. Wall EH, Doane PH, Donkin SS, Bravo D, 2014, The effects of supplementation with a blend of cinnamaldehyde and eugenol on feed intake and milk production of dairy cows, *J Dairy Sci*, 97, 9, 5709-17.
230. Wathes DC, 2012, Mechanisms linking metabolic status and disease with reproductive outcome in the dairy cow, *Reprod Domest Anim*, 47, s4, 304-12.
231. Weiss WP, Hogan JS, 2005, Effect of selenium source on selenium status, neutrophil function, and response to intramammary endotoxin challenge of dairy cows, *J Dairy Sci*, 88, 12, 4366-74.
232. Witter AR, Okunnu BM, Berg RE, 2016, The essential role of neutrophils during infection with the intracellular bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*, *J Immunol*, 197, 5, 1557-65.
233. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW, 2010, Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases, *Rheumatology*, 49, 9, 1618-31.
234. Yagi Y., Shiono H., Chikayama Y., Ohnuma A., Nakamura I., Yayou KI, 2004, Transport stress increases somatic cell counts in milk, and enhances the migration capacity of peripheral blood neutrophils of dairy cows, *J Vet Med Sci*, 4, 381-7.
235. Yong-Jun Liu, 2001, Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity, *Cell*, 106, 259-62.
236. Zeljković SĆ, Topčagić A, Požgan F, Štefane B, Tarkowski P, Maksimović M, 2015, Antioxidant activity of natural and modified phenolic extracts from *Satureja montana* L, *Ind Crop Prod*, 76, 1094-9.
237. Zerbe H, Schneider N, Leibold W, Wensing T, Kruip TA, Schuberth HJ, 2000, Altered functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver, *Theriogenology*, 54, 5, 771-86.
238. Zerbe H, Schneider N, Ossadnik C, Wensing T, Kruip T, Grunert E, Leibold W, 1998, Properties of neutrophilic granulocytes from blood and uterus of periparturient cows, *Wien Tierarztl Monatsschr*, 85, 9, 304-9.
239. Zerbe H, Schuberth HJ, Hoedemaker M, Grunert E, Leibold W, 1996, A new model system for endometritis: basic concepts and characterization of phenotypic and functional properties of bovine uterine neutrophils, *Theriogenology*, 46, 8, 1339-56.
240. Zerbe i sar., 1993 Zerbe H, Schubert HJ, Hoedemaker M, Grunert E, Leibold W, 1994, Functional and phenotypic investigations with bovine neutrophilic granulocytes from blood and uterus, *Reprod Domest Anim (Germany)*
241. Zgórká G, Główniak K, 2001, Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the *Lamiaceae* family, *J Pharm Biomed Anal*, 26, 1, 79-87.
242. Zhou Z, Loor JJ, Piccioli-Cappelli F, Librandi F, Lobley GE, Trevisi E, 2016, Circulating amino acids in blood plasma during the peripartal period in dairy cows with different liver functionality index, *J Dairy Sci*, 99, 3, 2257-67.
243. Zydadlo JA, Lamarque AL, Maestri DM, Gosso NR, 1995, Use of essential oils as natural antioxidants, *Grasas Aceites*, 46, 285-8.
244. Oltenacu, P.A. and Broom, D.M. 2010. The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. *Anim. Welfare*, 19 (S), 39-49.

BIOGRAFIJA AUTORA

Marina Žekić Stošić je rođena 9. februara 1982. u Novom Sadu. Gimnaziju „Isidora Sekulić“ završila je 2001. godine u Novom Sadu. Iste godine upisuje Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Novom Sadu, smer veterinarska medicina. Osnovne studije je završila 2008. godine. Odbanom master rada po nazivom “Dijagnostika hromosti kod krava u farmskim uslovima držanja” stiče zvanje doktora veterinarske medicine 2009. godine. Iste godine upisuje doktorske studije na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, smer veterinarska medicina.

Od 2009. godine zaposlena na Naučnom institutu za veterinarstvo „Novi sad“, na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije „Kontrola biohazardnih agenasa na farmama i primena biotehnoloških postupaka sa ciljem da se redukuju rizici u sistemu bezbedne hrane i obezbedi neškodljivo uklanjanje animalnog otpada“. Zvanje istraživača pripravnika stiče 2009. godine. Tokom 2011. godine stiče zvanje istraživača saradnika i nastavlja angažovanje na sledećem projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije „Istraživanje farmakoloških karakteristika antimikrobnih agenasa, uvođenje novih tehnoloških rešenja i alternativnih metoda profilakse s ciljem da se poboljša kontrola infektivnih oboljenja domaćih životinja“. Takođe, učestvuje u nekoliko međunarodnih projekata. Do 2017. godine je bila uključena u svakodnevne rutinske i istraživačke aktivnosti odeljenja za ispitivanje lekova i toksikologiju, a zatim na odeljenju za serološko imunološka i biohemijska ispitivanja.

Iz dosadašnjeg naučnog rada proizišlo je više od trideset radova i saopštenja na skupovima, međunarodnog i nacionalnog značaja.