

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

**10. NAUČNI SIMPOZIJUM**  
**REPRODUKCIJA DOMAĆIH ŽIVOTINJA**  
**I BOLESTI MLEČNE ŽLEZDE**

**ZBORNİK PREDAVANJA**

Divčibare, 10 - 13. oktobar 2019.

10. NAUČNI SIMPOZIJUM „REPRODUKCIJA DOMAĆIH ŽIVOTINJA I BOLESTI MLEČNE ŽLEZDE“  
X SCIENTIFIC SYMPOSIUM „REPRODUCTION OF DOMESTIC ANIMALS AND MAMMARY GLAND DISEASES“

– Zbornik radova / *Proceedings* –

**Organizatori / *Organized by***

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu  
*Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade*

Dekan Fakulteta veterinarske medicine  
*Dean of the Faculty of Veterinary Medicine*  
Prof. dr Vlado Teodorović

Katedra za porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje  
*Department of Reproduction, Fertility and Artificial Insemination*

Uz podršku / *Supported by*  
Veterinarske komore Srbije / *Veterinary Chamber of Serbia*

**Počasni predsednik / *Honorary Chairmen***

Prof. dr Vojislav Pavlović

**Predsednik / *Chairmen***

Prof. dr Slobodanka Vakanjac

**Sekretar / *Secretary***

Prof. dr Dragan Gvozdić

**Organizacioni odbor / *Organizing Committee***

Prof. dr Dragan Šefer, dr sci. vet. med. Željko Sladojević, prof. dr Milenko Šarić,  
doc. dr Miloš Petrović, prof. dr Marko Samardžija, mr sci. vet. med. Saša Bošković,  
dr sci. vet. med. Dobrila Jakić-Dimić, dr sci. vet. med. Goran Jakovljević,  
prof. dr Sava Lazić, dr sci. vet. med. Zoran Rašić, Maja Gabrić

**Naučni odbor / *Scientific Committee***

Prof. dr Miloš Pavlović, predsednik, prof. dr Danijela Kirovski, prof. dr Vladimir Magaš,  
prof. dr Toni Dovenski, prof. dr Otto Szenci, prof. dr Opsomer Geert

**Sekretarijat / *Secretariat***

Prof. dr Dragan Gvozdić, Maja Gabrić

**Odgovorni urednik / *Editor in Chief***

Prof. dr Miodrag Lazarević

**Tehnički urednik / *Technical Editor***

Gordana Lazarević

**Grafički dizajn i izrada korica / *Cover design***

Dragan Lozanov

Logo: Katarina Lončar

**Izdavač / *Publisher***

Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Centar za izdavačku delatnost i promet učila

**Štampa / *Printing***

Naučna KMD, Beograd

Tiraž: 450 primeraka

## SADRŽAJ

### PLENARNI REFERATI

1. **Pavlović Miloš, Đurić Miloje, Čibić Strahinja:**  
Urgentna ultrazvučna dijagnostika genitalnog trakta pasa  
*Urgent ultrasound diagnostics of the dog's genital tract* ..... 3
2. **Magaš Vladimir, Đurić Miloje, Stanišić Ljubodrag:**  
Komplikacije posle sterilizacije kod malih životinja i kako ih rešiti  
*Complications following small animal's sterilisation  
and how to solve them* ..... 11
3. **Mrkun Janko:**  
Multiple ovulation and embryo transfer in Slovenia  
*Multipla ovulacija i embrio transfer u Sloveniji* ..... 21
4. **Podpečan Ožbolt:**  
Embryo transfer in cattle; different responses and failures  
to hormonal treatments in recipients  
*Embriotransfer kod goveda; različiti odgovori i uzroci  
neuspeha prilikom hormonske terapije primaoca* ..... 37
5. **Zakošek Pipan Maja:**  
Animal oocyte and embryo preservation  
*Prezervacija oocita i embriona životinja* ..... 47
6. **Šterbenc Nataša:**  
Culture media in embryo transfer procedure  
*Mediji u proceduri prenosa embrija* ..... 65
7. **Bajcsy, Árpád Csaba:**  
Uterine infections affect involution in dairy cows  
*Infekcije uterusa utiču na njegovu involuciju kod mlečnih krava* ..... 79

<b>8. Szenci Otto:</b>	
Diagnosis of foetal and neonatal well-being of dairy calves	
<i>Dijagnostika fetalne i neonatalne vitalnosti kod muznih krava</i> .....	101
<b>9. Bačić Goran, Maćešić Nino, Karadjole Tugomir, Lojkić Martina, Prvanović Babić Nikica, Samardžija Marko, Benić Miroslav, Daud Josip, Fumić Tihana, Bačić Iva:</b>	
Najnovija istraživanja i dostignuća u dijagnostici i liječenju mastitisa u krava	
<i>New researches in bovine mastitis diagnostics and treatment</i> .....	135
<b>10. Dovenski Toni, Grizelj Juraj, Ilievska Ksenija, Atanasov Branko, Vince Silvijo, Nikolovski Martin, Dovenska Monika, Janevski Aleksandar, Nektarios D. Giadinis:</b>	
Mastitisi kod malih preživara, etiologija, prevalenca i kontrola	
<i>Mastitis in small ruminants, etiology, prevalence and management</i> .....	143
<b>11. Otavá Gabriel:</b>	
Mastitis therapy in dairy cows – present and future	
<i>Terapija mastitisa kod mlečnih krava – sadašnjost i budućnost</i> .....	153
<b>12. Vakanjac Slobodanka, Maletić Milan, Nedić Svetlana:</b>	
Neantibiotski pristup kontroli mastitisa krava	
<i>Non-antibiotic approach to mastitis control in cows</i> .....	171
<b>13. Fratrić Natalija, Stojić Milica, Gvozdić Dragan:</b>	
Specifičnosti imunskog odgovora mlečne žlezde i otpornost na mastite kod mlečnih krava	
<i>Mammary gland immunity and resistance to mastitis in dairy cows</i> .....	181
<b>14. Savić Radovanović Radoslava, Zdravković Nemanja:</b>	
Mastitisi kod koza	
<i>Mastitis in goats</i> .....	201
<b>15. Kukulj Vladimir:</b>	
Patomorfološke karakteristike važnijih mastitisa kod domaćih životinja	
<i>Pathomorphological characteristics of important forms of mastitis in domestic animals</i> .....	215

## KRATKA SAOPŠTENJA

- 16. Barna Tomislav, Milovanović Aleksandar, Apić Jelena, Gvozdić Dragan:**  
Uticao vakcine *Porcilis PRRS* na kvalitet sperme nerastova – prikaz slučaja  
*Effect of porcilis prrs vaccine on boar semen quality – case report* ..... 229
- 17. Bojkovski Jovan, Prodanov-Radulović Jasna, Vakanjac Slobodanka, Becskei Zsolt, Zdravković Nemanja, Stanišić Ljubodrag, Maletić Jelena, Đurić Miloje, Dobrosavljević Ivan:**  
Zdravstvena zaštita krmača i nerastova (pregled istraživanja)  
*Health control of sows and boars (review reaserch)* ..... 231
- 18. Lazarević Miodrag, Milovanović Aleksandar, Barna Tomislav:**  
Antivirusno delovanje semene plazme sisara  
*Antiviral properties of the mammalian seminal plasma* ..... 241
- 19. Milovanović Aleksandar, Barna Tomislav, Apić Jelena, Lazarević Miodrag, Kujača Velibor:**  
Cervicitis, paracervicitis i skleroza grlića – dijagnoze koje se često previde  
*Cervicitis, paracervicitis and cervical sclerosis – frequently overlooked diagnoses* ..... 245
- 20. Radanović Oliver, Vojinović Dragica, Jezdimirović Nemanja, Bojkovski Jovan, Kureljušić Jasna, Pavlović Ivan, Zdravković Nemanja:**  
Mastitisi krava uzrokovani *Staphylococcus aureus* na području Beograda  
*Staphylococcus aureus mastitis in dairy cows in Belgrade area* ..... 259
- 21. Zdravković Nemanja, Savić Božidar, Savić Radovanović Radoslava, Žutić Jadranka, Pavlović Marija, Kureljušić Branislav, Radanović Oliver:**  
Dijagnostika mikoplazmatskih mastitisa  
*Mycoplasma mastitis diagnostic* ..... 261

<b>22. Žekić-Stošić Marina, Ratajac Radomir, Barna Tomislav, Apić Jelena, Savić Sara, Milovanović Aleksandar, Lazarević Miodrag:</b>	
Uticaj etarskog ulja thymus vulgaris na funkcionalnu aktivnost neutrofilnih granulocita krvi krava u peripartalnom periodu u uslovima <i>in vitro</i>	
<i>In vitro influence of thymus vulgaris essential oil on the functional activity of bovine neutrophil granulocytes during peripartal period</i> .....	263

#### **SPONZORISANA PREDAVANJA**

<b>23. FM PHARM</b> .....	269
<b>24. NUTRIVET</b> .....	281
<b>INDEKS AUTORA</b> .....	287
<b>SPONZORI</b> .....	289

**SPECIFIČNOSTI IMUNSKOG ODGOVORA MLEČNE ŽLEZDE I  
OTPORNOST NA MASTITE KOD MLEČNIH KRAVA****MAMMARY GLAND IMMUNITY AND RESISTANCE TO MASTITIS  
IN DAIRY COWS****Fratrić Natalija, Stojić Milica, Gvozdić Dragan**

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

*Kratak sadržaj*

*Imunitet mlečne žlezde zavisi od koordinisanog delovanja elemenata nespecifičnog i specifičnog imuniteta, što uključuje, kako anatomske karakteristike žlezde tako i ćelijske i humoralne odbrambene komponente. Primarne uloge imunskog sistema su da prevenira invaziju - naseljavanje mlečne žlezde bakterijama, eliminiše postojeću infekciju i uspostavi normalnu funkciju tkiva mlečne žlezde. Više spoljašnjih i unutrašnjih faktora može uticati na slabljenje imunskog odgovora domaćina, koji dodatno zavisi od virulentnosti i otpornosti različitih mikroorganizama, izazivača mastitisa. Stoga je poznavanje imuniteta mlečne žlezde, kako u fiziološkim tako i u uslovima inflamacije, ključno za razumevanje prirode intramamarnih infekcija. Imunski odgovor mlečne žlezde varira u zavisnosti od perioda laktacije mlečnih krava i suprimiran je kod stresa, oko perioda zasušenja i partusa što povećava osetljivost mlečne žlezde na mastitise.*

**Ključne reči:** imunitet, mastitisi, mlečna žlezda, mlečne krave

*Summary*

*Mammary gland (MG) immunity depends on the complex combination and coordination of nonspecific and specific protective elements, including the anatomical features of the gland, as well as cellular and humoral defence components. The primary roles of the bovine immune system are to prevent bacterial invasion of the mammary gland, eliminate existing infections, and restore mammary tissues to normal function. Adequate immune functions are essential for host defence against intramammary infection. However, several factors can attenuate the host immune response, and the possession of various virulence and resistance factors by different mastitis-causing microorganisms greatly limits immune defences and promotes establishment of intramammary infections. Understanding of MG immunity in both healthy and inflammatory conditions will be an impor-*

*tant key to understand the nature of intramammary infections caused by specific pathogens and greatly contributes to the development of effective control methods and detection techniques. MG immune defence varies over different stages of lactation in dairy animals and is typically depressed with exposure to stress and around drying-off and parturition, thus increasing susceptibility to mastitis*

**Key words:** dairy cattle, immunity, mammary gland, mastitis,

## Uvod

Imunitet mlečne žlezde zavisi od kombinacije i koordinacije elemenata nespecifičnog i specifičnog imuniteta, uključujući i anatomske karakteristike mlečne žlezde, kao i ćelijske i humoralne odbrambene komponente. Nespecifični imunski sistem uključuje brojne odbrambene mehanizme koji se aktiviraju odmah (za nekoliko sekundi ili minuta) po izlaganju bakterijama i čine prvu liniju odbrane protiv patogena kada oni prođu fizičku barijeru sisnog kanala i pre nego što specifični imunski sistem stupi u akciju. Specifični imunski sistem se aktivira za nekoliko dana i predstavlja specifičan odgovor na odgovarajuće bakterijske izazivače mastitisa. Odgovor specifičnog imunskog sistema je mnogo snažniji prema bakterijama sa kojima je već prethodno bio u kontaktu, dok sporije odgovara na one mikroorganizme sa kojima prvi put stupa u kontakt.

## Imunski sistem mlečne žlezde i njegove komponente

### *Koža sise i odbrambeni sistem sisnog kanala*

Sisni kanal predstavlja istovremeno fizičku barijeru i izvor antimikrobnih materija. Fizička barijera je obezbeđena sfinkterom glatke muskulature koji zatvara sisni kanal, prevenira isticanje mleka (zatvoren je između muža) i predstavlja prepreku za ulazak različitih patogena. Antimikrobnu odbranu čini nekoliko komponenti. Normalno je koža sise snabdevena masnim kiselinama koje usporavaju rast bakterija – potencijalnih patogena. Višeslojni pločasti epitel sisnog kanala proizvodi keratin (*stratum corneum*) koji oblaže sisni kanal i sprečava prodiranje mikroorganizama u cisternu mlečne žlezde kao i njihov rast. Keratin sadrži i antimikrobne materije (Paulrud, 2005).

Lipidne komponente čine masne kiseline koje imaju i bakteriostatsku i baktericidnu aktivnost. Dugolančane masne kiseline oštećuju lipidnu membranu bakterija dovodeći do perforacije njihovog ćelijskog zida. Gram pozitivne bakterije su mnogo osetljivije od gram negativnih na bakteriostatski i baktericidni efekat masnih kiselina u keratinu. Keratin sadrži i  $Ca^{2+}$ - vezujuće proteine koji takođe imaju antimikrobni efekat (Sordillo, 2018). Sadržaj lipida i njihov sastav u keratinu sisnog kanala može da varira tokom muže, između laktacija, u zasušenju i zavisno od težine intramamarnе infekcije. Oštećenje keratina kao rezultat nepravilne intramamarnе terapije ili postupka tokom muže povećava osetljivost sisnog kanala



prema bakterijama i povećava njihovo naseljavanje. Međutim, antimikrobna sposobnost keratina je ograničena, tako da bez obzira na fizičku i hemijsku odbranu, bakterije mogu da prodru kroz sisni kanal i izazovu intramamarnu infekciju. Određene vrste bakterija mogu da koloniziraju - nasele sisni kanal u dužem periodu, što je slučaj sa koagulaza-negativnim stafilokokama i bovinim korinebakterijama („*coagulase negative staphylococci*“, CNS; *Corynebacterium bovis*). Tokom ranog perioda zasušenja i neposredno pre teljenja, glatko-mišićne ćelije sisnog kanala su relaksirane u većoj meri usled povećanog pritiska zadržanog mleka. Nekompletno formiranje keratinske obloge, do 2 nedelje posle naglog prekida laktacije, u vezi je sa pojavom mastitisa. Posle muže, sisni kanal ostaje dilatiran i do 2h, tako da bakterije iz spoljne sredine imaju šansu da uđu u sisni kanal i dovedu do oštećenja keratina ili mukozne membrane koja oblaže cisternu sise. Tokom mašinske muže, mikroorganizmi prisustni na kraju sise mogu ući i proći kroz sisni kanal do cisterne. To je glavni mehanizam koji stoji iza širenja patogena - kontagioznih uzročnika mastitisa. Dezinfekcija sisa je važna i široko primenjivana praksa u prevenciji mastitisa i neophodna je radi kontrole populacije potencijalnih uzročnika oboljenja mlečne žlezde.

#### *Nespecifični imunski sistem i njegove komponente*

Nespecifični imunski sistem predstavlja prvu liniju odbrane mlečne žlezde i uključuje brojne odbrambene mehanizme koji se aktiviraju veoma brzo (za nekoliko sekundi ili minuta) od kontakta sa bakterijama. U zavisnosti od efikasnosti nespecifičnih odbrambenih mehanizama, bakterije koje su uzročnici mastitisa mogu biti neutralisane pre nego što dođe do bilo kakvih promena u mleku ili tkivu mlečne žlezde. Prepoznavanje i odgovor nespecifičnog imunskog sistema nisu visoko specifični i imunski odgovor ne traje dugo. Komponente nespecifičnog imunskog sistema postoje u samoj mlečnoj žlezdi ili može doći do njihovog brzog nakupljanja iz krvi na mestu infekcije posle aktivacije brojnim stimulusima.

Dve glavne osobine nespecifičnog imunskog sistema su: 1) prepoznavanje patogena i mogućnost da se razvije proinflamatorni odgovor, i 2) kompleks interakcija ćelijskih i molekularnih procesa u cilju otkrivanja i eliminisanja patogena. Brojne komponente koje su u vezi sa nespecifičnim imunskim odgovorom mogu se identifikovati u mleku: ćelijske komponente (leukociti), humoralne (komplement, pro- i anti-inflamatorni citokini), laktoferin, transferin, sistem laktoperoksidaza/mijeloperoksidaza, lizozim, reaktivne vrste kiseonika (ROS), proteini akutne faze (haptoglobin, serumski amilod A - SAA) i širok spektar antimikrobnih peptida i proteina.

*Ćelijske komponente i njihova uloga –  
leukociti: neutrofilni granulociti (NG), makrofagi, limfociti*

*Leukociti:* Leukociti u mlečnoj žlezdi obezbeđuju imunološki „nadzor“ u neinficiranoj mlečnoj žlezdi (funkcija nadzora). Oni takođe imaju i funkciju u restrukturiranju mlečne žlezde što se događa u involuciji (apoptoza). Pored funkcije u fagocitozi, leukociti mlečne žlezde izlučuju u mleko različite komponente (citokine, hemokine, ROS, antimikrobne proteine i peptide - laktoferin, defenzin i katelicidin) (Addis i sar., 2017).

U neinficiranoj mlečnoj žlezdi, limfociti i makrofagi su dominantni tip leukocita, dok je broj neutrofilnih granulocita relativno mali. Broj somatskih ćelija („*somatic cell count*“, SCC) u mleku zdrave mlečne žlezde je manji od  $10^5$  ćelija/ml mleka, a distribucija leukocita varira u zavisnosti od stadijuma laktacije. Neutrofilni granulociti su dominantni tip ćelija u mleku tokom zapaljenja i SCC može da poraste na više od  $10^6$  ćelija/ml mleka za nekoliko sati od prodora bakterija. Dolazak - privlačenje neutrofilnih granulocita je pokrenut citokinima i oksilipidima koji deluju direktno na krvne sudove kada se smanjuje brzina proticanja krvi uz povećanu ekspresiju adhezivnih molekula na endotelnim ćelijama. Adhezivni molekuli na leukocitima se "kače" za adhezivne molekule na endotelu i pomažu migraciju leukocita iz krvi na mesto infekcije. Kretanje neutrofilnih granulocita unutar tkiva je posredovano hemotaktičnim gradijentom. Oni brzo migriraju i akumuliraju se u napadnutom tkivu za manje od 30-60 minuta posle oštećenja. Brzina i obim migracije neutrofila u mlečnu žlezdu i mleko su glavni faktori koji utiču na uspostavljanje intramamarne infekcije.

Leukociti pomažu i u reparaciji oštećenog tkiva izazvanog širenjem i obnavljanjem inflamatornog procesa. Uprkos prisustvu značajnog broja imunskih ćelija u mlečnoj žlezdi, može se reći da je mlečna žlezda u imunološkom smislu „inferiorna“ kada se uporedi sa ostatkom organizma. Osnovu za ovakvu tvrdnju nalazimo u činjenici da je aktivnost svih tipova leukocita u mleku u poređenju sa krvlju smanjena – redukovana.

*Neutrofilni granulociti:* Ove ćelije imaju važnu ulogu u nespecifičnom imunskom odgovoru protiv intramamarnih infekcija. Oni su prisutni i u zdravoj mlečnoj žlezdi, a sisanje i muža (jer se mleko prazni, uklanja) stimulišu direktnu migraciju svežih neutrofilnih granulocita u tkivo mlečne žlezde. Neutrofili goveda prolaze kroz epitel mlečne žlezde dijapedezom bez izazivanja oštećenja ćelija, osim u slučajevima obimne migracije kada su moguća i mehanička i hemijska oštećenja (Lin i sar., 1995).

Neutrofilni granulociti mogu lako i brzo da prođu između epitelnih ćelija i stižu kao prve imunske ćelije na mesto infekcije. Kako se malo, zrelih neutrofilnih granulocita nalazi u kostnoj srži, broj nezrelih NG u cirkulaciji raste kao rezultat njihove mobilizacije u cirkulaciju tokom inflamacije. Broj zrelih NG je u negativnoj korelaciji sa težinom mastitisa. Kod nezrelih neutrofilnih granulocita nije potpuno

razvijeno više značajnih funkcija uključujući fagocitozu, intracelularnu razgradnju bakterija i hemotaksu.

Uloga NG u fagocitozi se ostvaruje preko dva paralelna sistema. Prvi je zavisan od kiseonika (engl. „*respiratory burst*“, respiratorni prasak) koji podrazumeva proizvodnju kiseoničkih i hidroksilnih radikala. Drugi sistem je nezavisan od kiseonika i dovodi do oslobađanja peroksidaza, lizozima, hidrolitičkih enzima i laktoferina. Neutrofilni granulociti, pored fagocitoze, doprinose povećanju propustljivosti kapilara i oslobađaju više zapaljenskih medijatora koji igraju bitnu ulogu u koordinaciji delovanja nespecifičnog i specifičnog imunskog sistema. Oni imaju i intracelularne granule koje sadrže baktericidne materije – peptide, defenzine, enzime (mijeloperoksidaze), neutralne i kisele proteaze (elastaza, katepsin) koje mogu da unište patogene bakterije. Proteaze su uključene i u regulaciju dužine trajanja – limitiranje - imunskog odgovora (degradiraju neke citokine kao što su interleukini IL-2, IL-6, IL-8). Razgrađene bakterije se zatim egzocitozom izbacuju iz NG sa malim kolateralnim oštećenjem tkiva mlečne žlezde. NG su manje efikasni u fagocitozi bakterija ukoliko unesu masti, kazein i druge komponente mleka. Fagocitna i baktericidna aktivnost NG se može značajno povećati u prisustvu antitela, opsonina za specifične bakterije. Kada obave svoj zadatak oni podležu apoptozi (programiranoj ćelijskoj smrti) i bivaju uklonjeni od strane makrofaga.

Neutrofilne ekstraćelijske mreže (engl. „*neutrophil extracellular trap*“) pripadaju nespecifičnom imunskom sistemu i predstavljaju poseban antibakterijski odbrambeni mehanizam. Ovaj mehanizam vezuje i uništava bakterije nezavisno od fagocitoze u mlečnoj žlezdi i može da služi i kao fizička barijera koja sprečava širenje bakterija u tkivima.

**Makrofagi:** Ove ćelije nastaju od monocita krvi i diferenciraju se u makrofage u mlečnoj žlezdi. One predstavljaju dominantni tip ćelija u mleku i tkivu, kako zdrave mlečne žlezde u involuciji tako i u laktaciji (Napel i sar., 2009).

Makrofagi utiču i na nespecifični i na specifični imunski odgovor. Oni doprinose izazivanju specifičnog lokalnog imunskog odgovora kao „antigen prezentujuće ćelije“ (engl. „*antigen presenting cells*“, APC ćelije) jer obrađuju i prezentuju antigen udružen sa molekulima glavnog histokompatibilnog kompleksa II klase (engl. „*major histocompatibility complex*“, MHC II). Kao i neutrofilni granulociti i makrofagi mogu obavljati različite nespecifične funkcije uključujući ingestiju i fagocitozu stranih materija (*Staph. aureus*), njihovo uništavanje proteazama i ROS-om. One mogu da vrše ingestiju ćelijskog „otpada“ i akumuliranih komponenti mleka u involuciji mlečne žlezde. Fagocitna aktivnost makrofaga može se povećati u prisustvu antitela - opsonina za specifični patogen. Makrofagi goveda imaju receptore za imunoglobuline (IgG<sub>1</sub> i IgG<sub>2</sub>). Za razliku od NG, oni imaju manje Fc receptora, što smanjuje njihov kapacitet za fagocitozu. Baktericidna aktivnost makrofaga u mlečnoj žlezdi varira u zavisnosti od njene sekrecije i oni ispoljavaju veću fagocitnu aktivnost u periodu zasušenja nego u laktaciji. Njihova najznačajnija uloga kao

,nespecifičnog odbrambenog sistema mlečne žlezde, nije u fagocitozi već u privlačenju i baktericidnoj aktivnosti neutrofilnih granulocita.

*Limfociti:* Limfociti su ćelije koje su uključene u specifični imunski odgovor. U mlečnoj žlezdi postoje posebne populacije T i B limfocita i NK ćelija (engl. „natural killer“). Broj i vrste limfocita u mleku se značajno menjaju tokom intramamarnе infekcije. Jednom aktivirani limfociti, mogu regulisati zajedno i specifični i nespecifični imunski odgovor. Specifični imunski odgovor je posredovan ćelijama pamćenja koje brzo odgovaraju na patogen kojem su limfociti prethodno već bili izloženi. Prisustvo ove specifične subpopulacije limfocita može uticati na ukupnu funkciju limfocita, pa čak na imunski odgovor u celini (Alnakić i sar., 2014). Primer za to je da aktivacija subpopulacije CD8+ T ćelija tokom infekcije mlečne žlezde određenim patogenom (*Staph. aureus*) može suprimirati imunski odgovor domaćina i predisponirati mlečnu žlezdu prema hroničnom procesu. Kod zdrave mlečne žlezde goveda,  $\alpha, \beta$  T ćelije preovladavaju i u sekretu i parenhimu i najviše je zastupljen fenotip CD8+, što je u kontrastu sa krvi, gde je dominantni tip T ćelijske subpopulacije CD4+. Odnos CD4+/CD8+ T ćelija je manji u mleku nego u krvi. Limfociti T „pomoćničke“ populacije (engl. Th – „helper“) koji pripadaju CD4+ tipu ćelija proizvode različite imunoregulatorne citokine nakon prepoznavanja antigena (Ag) vezanog za MHC II molekule i predstavljaju ćelije pamćenja nakon kontakta sa Ag. Subpopulacija CD8+ limfocita može vršiti ili citotoksičnu ili supresorsku funkciju. U kordinaciji sa MHC I molekulima, citotoksični T limfociti prepoznaju i eliminišu promenjene sopstvene ćelije. Međutim uklanjanje oštećenog epitela mlečne žlezde može povećati osetljivost prema infekcijama. Supresorske T ćelije igraju ulogu u kontroli i modulaciji imunskog odgovora mlečne žlezde. Uloga CD8+ limfocita u imunoregulaciji takođe zavisi od stadijuma laktacije, tako da oni u sredini laktacije kod mlečnih krava, ispoljavaju citotoksičnu aktivnost i uglavnom ekspimiraju interferon-gama (IFN $\gamma$ ), dok CD8+ limfociti u postpartalnom periodu nemaju citotoksičnu aktivnost i uglavnom ekspimiraju interleukin-4 (IL-4).

Preživari imaju više  $\gamma, \delta$  T limfocita u parenhimu i sekretu mlečne žlezde u odnosu na krv. Ovi limfociti mogu da posreduju u citotoksičnosti sličnoj onoj uzazvanoj NK ćelijama i mogu da unište izmenjene epitelne ćelije. Oni prvenstveno migriraju na površinu epitela i obezbeđuju jedinstvenu barijeru u mikrosredini mucoze protiv bakterijskim patogena.

NK ćelije su subpopulacija limfocita koja ima značajnu ulogu u nespecifičnom imunitetu mlečne žlezde jer ima kapacitet da uništava gram-pozitivne (GPB) i gram-negativne (GNB) bakterije i može biti značajna u prevenciji intramamarnih infekcija. NK ćelije stimulisane citokinima su u stanju da unište bakterije otpuštanjem baktericidnih peptida (imaju citotoksičnu aktivnost nezavisnu od MHC antigena).

**Distribucija ćelijskih komponenti u mlečnoj žlezdi krava**

Distribucija leukocita u zdravoj mlečnoj žlezdi razlikuje se tokom laktacije i perioda zasušenja. Neutrofilni granulociti su zastupljeni u većem procentu tokom rane i kasnije laktacije, dok procenat limfocita opada. Procenat makrofaga je veći u ranom postpartalnom periodu nego u kasnoj laktaciji. U zasušenju, broj somatskih ćelija može značajno da poraste. Povećanje SCC na početku involucije je posledica priliva ćelija kao rezultat prestanka izlučivanja mleka ili koncentracionog efekta usled prestanka sekrecije tečne faze. Tokom zasušenja, broj neutrofila je visok tokom rane involucije (40-80%) kao i u kolostrumu, smanjuje se od druge do četvrte nedelje zasušenja i onda se kod potpune involucije vraća na vrednosti tokom laktacije. Broj makrofaga na početku zasušenja - rane involucije je mali kao i u kolostrumu, a maksimalni broj dostiže u sredini zasušenja (30%) što se zadržava do teljenja. Broj limfocita se povećava tokom zasušenja - involucije i zatim opada oko partusa.

**Tabela 1.** Ćelijske komponente u mlečnoj žlezdi kod krava (Alnakip i sar., 2014)

Vrste leukocita	Zdrava mlečna žlezda	Mastitis
Leukociti	75% od SCC	Veliko povećanje u zavisnosti od težine mastitisa
Makrofagi	35%-79% od ukupnog broja leukocita u mleku	9%-32%
Limfociti	10%-28% (T limf. 40-50%; B limf. 20-25%)	14%-24%
Neutrofilii	3%-26%	90%

**Epitelne ćelije mlečne žlezde i imunitet**

Epitelne ćelije mlečne žlezde doprinose nespecifičnom i inflamatornom imunskom odgovoru (Porcherie i sar., 2012). One na svojoj površini ekspimiraju više vrsta receptora: TLR (engl. „*Toll like receptors*“,) kao i polimerni imunoglobulinski (Ig) receptor, što olakšava prolazak IgA kroz epitel u alveole. Nakon stimulacije epitela bakterijama, one luče različite efektorne molekule nespecifičnog imunskog sistema kao i medijatore zapaljenja, što dovodi do privlačenja leukocita iz cirkulacije. Epitelne ćelije stvaraju IL-8 (vrlo potentni hemoatraktant za neutrofilne granulocite) u prisustvu GPB bakterija i njihovih toksina, kao i u prisustvu IL-1 $\beta$  i lipopolisaharida (LPS) iz GNB bakterija. One su značajni izvori metabolita arahidonske kiseline, proteina akutne faze,  $\beta$  defenzina, katelicidina i kalprotektina, kao i LPS-vezujućih proteina, koji su uključeni u prepoznavanje ćelijskog zida bakterija. Epitelne ćelije mlečne žlezde mogu imati i zaštitnu i ulogu u fagocitozi ingestijom i digestijom fagocitovanih mikroba i komponenti mleka (kapljice masti,

kazein) formiranjem pseudopoda. Ovaj efekat je izraženiji kod mlečne žlezde koja nije u laktaciji.

### **Prepoznavanje uzročnika mastitisa posredstvom nespecifičnog imunskog sistema**

Nespecifični imunski sistem mlečne žlezde se aktivira kada se receptori na površini ili u ćelijama, prvenstveno leukocitima i epitelnim ćelijama, vežu za molekule udružene sa patogenima (engl. „*pathogen associated molecular patterns*“, PAMP) (Porcherie i sar., 2012). Prepoznavanje bakterija (PAMP) vrši se preko tri različite familije receptora: TLR, nukleotid - vezujućeg oligomerizacionom domenu sličnog receptora (engl. „*nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor*“, NLR) i receptora gena 1 indukovano retinoičnom kiselinom (engl. „*retinoic acid inducible gene 1*“, RIG1). TLR su najzastupljeniji receptori uključeni u prepoznavanje bakterija i kod goveda su u odnosu na druge receptore najbolje okarakterisani. Oni prepoznaju širok spektar PAMP. Mogu biti eksprimirani na površini ćelije ili su udruženi sa intraćelijskim vezikulama. Svaki TLR može otkriti odgovarajući - poseban PAMP poreklom od bakterija. Posle prepoznavanja i vezivanja receptora za PAMP, aktivira se unutarćelijski signalni put uključujući jedarni faktor NF- $\kappa$ B (engl. „*nuclear factor*“) koji kontroliše ekspresiju više rastvorljivih medijatora kao što su citokini koji aktiviraju čitav niz kaskadnih reakcija u okviru zapaljenjskog procesa.

Kako imunske tako i ne-imunske ćelije, u mlečnoj žlezdi imaju receptore koji prepoznaju i reaguju sa različitim molekulskim grupama, antigenskim determinantama (PAMP). TLR su familija transmembranskih proteina eksprimiranih ne samo na leukocitima već i na endotelnim, epitelnim ćelijama i fibroblastima koji su raspoređeni u tkivu mlečne žlezde. Posebno su značajni TLR2 i TLR4 receptori za odbranu mlečne žlezde, zato što oni prepoznaju PAMP koji su u vezi sa GPB (engl. „*peptidoglycans*“, PG) i GNB bakterijama (engl. „*lipopolysaccharide*“, LPS) uzročnicima mastitisa (*Staph. aureus*, *S. uberis*, *E. coli*).

### **Indukcija imunskog odgovora na GNB i GPB bakterije (bakterijske komponente koje prepoznaje nespecifični imunski sistem)**

Lipoproteini u ćelijskom zidu GNB bakterija (LPS) imaju centralnu ulogu u patogenezi mastitisa izazvanog tim bakterijama (Akira i Takeda, 2004). Kao jedan od najboljih imunostimulatora, LPS je i ključni faktor virulencije GNB bakterija u izazivanju kliničkih simptoma. Prepoznavanje LPS se ostvaruje preko membranskih CD14, LPS-LBP, proteina akutne faze (engl. „*acute phase proteins*“, APP) prisutnih u cirkulaciji i TLR na epitelnim ćelijama (TLR4). Pokretanje akutnog inflamatornog odgovora dovodi do povećanja broja somatskih ćelija u mleku, aktivacije leukocita, proizvodnje antimikrobnih proteina i peptida (lizozim - LZ; laktoferin - LF), lipidnih medijatora (ciklooksigenaza-2 i 5-lipoksigenaza), hemokina (CXCL5,

RANTES), citokina a posebno IL-6, tumor nekrotičnog faktora alfa (TNF- $\alpha$ ) i insulinu-sličnog faktora rasta 1 (IGF-1).

Kod GPB bakterija identifikovano je više komponenti koje imaju imunostimulatornu ulogu (lipoproteini ćelijskog zida). Peptidoglikani (PG) i lipotejhonska lise-lina (LTA) stimulišu monocite i makrofage da proizvode inflamatorne citokine i hemokine. Takođe su pojedina istraživanja dokazala da LTA može izazvati ekspresiju citokina (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$ ) u epitelnim ćelijama. Virulentnost bakterijskih komponenti kao što su LPS i LTA varira u zavisnosti od kojih bakterija potiče). TLR2 igra najvažniju ulogu u prepoznavanju gram pozitivnih bakterija (Kawai i Akira, 2010).

### Komponente humoralne odbrane

Komponente humoralne odbrane čine: laktoferin - LF, transferin- TF, lizozim - LZ, sistem komplementa, citokini, hemokini, faktori rasta, odbrambeni proteini (engl., „*host defence peptides*“, HDPs) (Sordilo, 2018).

*Laktoferin* doprinosi imunitetu mlečne žlezde, imunomodulaciji i transkripciji različitih molekula. Laktoferin je gvožđe-vezujući protein i bakterije sa visokim zahtevima za gvožđem su osetljive na bakteriostatsku aktivnost laktoferina. Od bakterija uzročnika mastitisa, najosetljivija na efekat laktoferina je *E.coli*, zatim *Staph. aureus*, dok su streptokoke otpornije. Laktoferin je u mlečnoj žlezdi uglavnom proizvod sekretornog epitela, a manje neutrofila. On oštećuje spoljašnju membranu, menja integritet i propustljivost ćelijskog zida. Interakcija laktoferina sa GPB još uvek nije u potpunosti rasvetljena, iako je dokazano da može da se vezuje za receptore na ćelijskom zidu nekih GPB izazivača mastitisa kao što su *S. uberis*, *S. agalactiae*, *Staph. aureus* i neke koagulaza-negativne stafilokoke i da na taj način ometa adherenciju i invaziju epitelnih ćelija mlečne žlezde bakterijama. Koncentracija laktoferina u kolostrumu je visoka (preko 5mg/ml), a posle toga ona brzo opada kako proces laktacije odmiče i u mleku je normalna koncentracija 200-485  $\mu$ g/ml ili manje, u zavisnosti od dnevne proizvodnje mleka i stadijuma laktacije. U periodu zasušenja, koncentracija laktoferina se povećava i maksimum dostiže u trećoj do četvrtoj nedelji (20-30 mg/ml) involucije. Smatra se da ova visoka koncentracija laktoferina u periodu zasušenja inhibira rast bakterija i doprinosi malom broju intramamarnih infekcija u ranom periodu zasušenja. Tokom mastitisa, koncentracija laktoferina u mleku može biti povećana i 30 puta u zavisnosti od težine infekcije i uzročnika.

*Transferin* je takođe protein u mleku mlečnih krava koji vezuje gvožđe i zastupljen je u niskoj koncentraciji. Njegova koncentracija u mleku je 0,02-0,04 mg/ml, tri nedelje postpartalno, a u kolostrumu 1,07 mg/ml. Transferin u mleku ne potiče iz mlečne žlezde već u nju prelazi iz krvi procesom transcitoze u zdravoj mlečnoj žlezdi, dok kod mastitisa dospeva procesom eksudacije krvne plazme. On deluje na GNB tako što pravi oštećenja i menja permeabilnost ćelijske membrane.

*Lizozim* ima inhibitorni efekat ili litičku aktivnost prema GPB, a ovi efekti su manje izraženi kod GNB. On je komponenta antibakterijskog sistema mleka i deluje sinergistički sa antitelima, komplementom i laktoferinom. Koncentracija lizozima u mleku zavisi od rase, perioda laktacije, zdravlja, starosti i pariteta. Nakon partusa, koncentracija lizozima u mleku raste i najveća je 7. dana (0,72 mg/l), dok se smanjuje u drugoj nedelji posle teljenja. Porast aktivnosti lizozima se može zapaziti u mleku krava sa mastitisom, gde može da se poveća i 10-50 puta. On može poticati iz krvi, a može biti i lokalno sintetisan u samoj mlečnoj žlezdi. Tokom mastitisa, lizozim uglavnom potiče iz leukocita (Priyadarshini i Kansal, 2002).

*Laktoperoksidaze/mijeloperoksidaze.* Laktoperoksidaza je enzim koga ima mnogo u mleku i on čini 0,5% ukupnih proteina mlečnog seruma (30 mg/l). Njegova koncentracija u kolostrumu je slična kao u punom mleku krava. Koncentracija laktoperoksidaze se povećava u mleku kod mastitisa. Lokalno sintetisana laktoperoksidaza ispoljava antibakterijske osobine (generisanje reaktivnih kiseoničkih vrsta - ROS) i protiv gram pozitivnih i gram negativnih bakterija. Mijeloperoksidaza je lokalizovana primarno u granulama neutrofila i ima bitnu ulogu u odbrani od mikroorganizama (kao deo antibakterijskog sistema zavisnog od kiseonika). Antibakterijska aktivnost mijeloperoksidaza uglavnom se odnosi na period zasušenja, dok je tokom laktacije inhibirana proteinima mleka. Dokazana je njihova značajna antibakterijska aktivnost protiv glavnih patogena uzročnika mastitisa kao što su *Staph. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dygalactiae*, *S. uberis* i *E. coli* (Fox i Kelly, 2006).

*Sistem komplementa* ima centralnu ulogu u nespecifičnom imunskom sistemu zato što je uključen u započinjanje i kontrolu zapaljenskih procesa, opsonizaciju površine bakterija, privlačenje i nakupljanje fagocita (hemoatraktanti: C3a, C5a), prepoznavanje i ingestiju mikroorganizama od strane fagocita (C3, C4), ubijanje mikroorganizama direktno ili u saradnji sa fagocitima. Različiti proteini sistema komplementa mogu uticati na imunski odgovor mlečne žlezde i predstavljaju značajnu vezu između nespecifičnog i specifičnog imunskog sistema. Tokom laktacije, kod zdrave mlečne žlezde je koncentracija komplementa u mleku niska, a viši nivo se zapaža na kraju laktacije, u kolostrumu i tokom involucije mlečne žlezde. Alternativni put aktivacije komplementa je jedini put koji funkcioniše kod zdrave mlečne žlezde, dok klasični put aktivacije nije funkcionalan zbog odsustva ili niske koncentracije C1q komponente komplementa u poređenju sa krvi. Alternativni put aktivacije komplementa dovodi do taloženja C3b i C3bi na bakterijama i do proizvodnje fragmenta C5a koji je uključen u privlačenje i aktivaciju fagocita, prvenstveno neutrofilnih granulocita. Međutim, najviša koncentracija komplementa se nalazi u mleku kod mastitisa. Tokom mastitisa, baktericidna i hemolitička aktivnost sistema komplementa je povećana u mlečnoj žlezdi i intenzitet njegove aktivnosti je u korelaciji sa intenzitetom imunskog odgovora (Sordillo, 2018).



### **Citokini, hemokini, faktori rasta, defensini**

*Citokini* su regulatorni glikoproteini koji se proizvode tokom zapaljenskog odgovora. Oni regulišu intenzitet i dužinu odgovora domaćina na infekciju uticajem na (povećanje ili inhibicija) aktivaciju, proliferaciju i diferencijaciju ćelija uključenih u imunski odgovor. Takođe su uključeni u pokretanje izlaska leukocita iz cirkulacije do mesta infekcije u mlečnoj žlezdi. Citokine luče, kako imunske tako i ne-imunske ćelije sa kapacitetom da regulišu različite aspekte imunskog odgovora, uključujući i zapaljenje. Postoji više kategorija citokina, podeljenih na osnovu strukture, funkcije i porekla: interleukini, interferoni, hemokini, faktori stimulacije kolonija (engl. „*colony stimulating factor*“, CSF), faktori nekroze tumora (TNF). U zdravoj mlečnoj žlezdi se mogu naći brojni citokini (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , GM-CSF, IL-8, IL-12) (Alluwaimi i Cullor, 2002).

Na početku, tokom progresije i rezolucije zapaljenja, citokini deluju i lokalno i sistemski. Oni predstavljaju vezu između nespecifičnog i specifičnog imuniteta. Važni su u odbrani domaćina od infekcije, ali takođe mogu imati i negativne efekte. Ravnoteža između pozitivnih i negativnih efekata citokina kod jedinke je određena dužinom, količinom i lokalizacijom njihove ekspresije. Utvrđen je njihov pozitivan efekat u imunoterapiji kod mastitisa jačanjem imuniteta mlečne žlezde (interferoni, IFN- $\gamma$ , IL-2). Takođe imaju doprinos u kontroli ili prevenciji mastitisa izazvanog sa *E. coli* i *Staph. aureus* (GM-CSF, G-CSF, IL-2, INF- $\gamma$ ), a postoji i potencijalni pozitivan efekat na odgovor kod tretmana antibioticima (IL-1, IL-2, INF- $\gamma$ ). Ekspresija citokina je veća i brža kod *E. coli* mastitisa u poređenju sa *Staph. aureus* mastitisom.

Citokini mogu da reguju i sa drugim citokinima sinergistički ili antagonistički. Oni imaju vrlo kratak poluživot. TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  brzo se ekspimiraju tokom rane faze infekcije i imaju proinflatornu funkciju, dok IL-4, IL-10, IL-17 aktivno pomažu rezoluciju infekcije.

*Hemokini* su molekuli značajni za migraciju i nakupljanje leukocita u mlečnoj žlezdi kod intramamarne infekcije, pored toga što su uključeni u više imunoregulatornih i inflamatornih procesa. Hemokini su grupisani u 4 familije: C, CC, CXC (ELR+, ELR-) i CX3C. Oni koji pripadaju ELR+ su potencijalni hemoatraktanti za neutrofilne granulocite i podstiču angiogenezu, dok su ELR- potencijalni hemoatraktanti za mononuklearne ćelije (Barber i sar., 1999).

Odbrambeni peptidi – *defenzini* predstavljaju veliku familiju molekula koji pripadaju nespecifičnom imunskom sistemu ali su i veza između nespecifičnog i specifičnog imunskog sistema. Više  $\beta$  defenzina (LAP, TAP-trahea antimikrobni peptid, goveđi  $\beta$  defenzin 1, 4, 5 neutrofila) je ekspimirano u tkivu mlečne žlezde i u zdravoj kao i u inficiranoj mlečnoj žlezdi, a izlučuju se i u mleko u odgovoru na izlaganje bakterijama.

Važna familija antiinflamatornih signalnih molekula su i oksilipidi ili eikozenoidi. Oni su poreklom od polinezasićenih masnih kiselina i mogu da regulišu broj-

ne aspekte inflamatornog odgovora. Makrofagi i endotelne ćelije su najveći izvori oksilipida u tkivima uključujući i mlečnu žlezdu, iako to mogu biti i druge ćelije. Kada makrofagi ili endotelne ćelije dođu u kontakt sa PAMP ili drugim zapaljenjskim stimulusom (citokini) dolazi do sinteze oksilipida. Posle kontakta ćelija i PAMP, polinezasićene masne kiseline se oslobađaju iz ćelijske membrane ili membrane jedra pomoću fosfolipaza i ovi supstrati masnih kiselina se zatim ne-enzimski oksidišu pomoću ROS-a ili različitim enzimskim putevima (ciklooksigenaza - COX; lipooksigenaza - LOX; citohrom P450) u kojima se proizvode oksilipidi koji mogu ili stimulisati ili zaustaviti inflamatornu kaskadu. U ranijim radovima koji su se bavili ispitivanjem uloge oksilipida u inflamatornom odgovoru mlečne žlezde fokus je bio stavljen na eikozanoide poreklom od arahidonske kiseline iz COX puta, kao što su prostaglandini (PGs), tromboksani (TX) i leukotrijeni (LT). Međutim, do danas je otkriveno više od 130 oksilipida. Za oksilipide TXB2 i PGE2 je dokazano, da kao proinflamatorni oksilipidi imaju ulogu u povećanju težine *E. coli* mastitisa u peripartalnom periodu (Sordillo, 2018).

Citokini i oksilipidi reaguju sa krvnim sudovima u mlečnoj žlezdi i menjaju tonus i protok krvi kroz napadnuto tkivo, povećavaju vazodilataciju i propustljivost kapilara, što je bitno za migraciju leukocita iz krvi na mesto infekcije.

## **Specifični imunski sistem i njegove komponente**

### *Ćelijske i humoralne komponente*

Limfociti odgovorni za specifični imunski odgovor mogu biti T i B limfociti i ove dve posebne subpopulacije limfocita se razlikuju u funkciji i ekspresiji različitih proteina. T ćelije čine subpopulacije  $\alpha, \beta$  T ćelija koje uključuju CD4<sup>+</sup> (pomoćničke - Th ćelije) i CD8<sup>+</sup> (citotoksične - Tc ćelije), kao i  $\gamma, \delta$  T ćelije. Na osnovu funkcionalnih grupa, Th ćelije se dele na Th1, Th2, Th17 i regulatorne T ćelije (T reg) (Aitken i sar., 2011; Sordillo, 2018).

Th ćelije proizvode citokine u odgovoru na prepoznavanje kompleksa Ag-MHC II na antigen-prezentujućim ćelijama (B limfociti, makrofagi, dendritične ćelije). Kada su aktivirani, Th limfociti proizvode citokine koji igraju ulogu u aktivaciji i T i B limfocita zajedno, makrofaga, neutrofilnih granulocita i drugih ćelija koje učestvuju u imunskom odgovoru. Tc limfociti štite mlečnu žlezdu od intraćelijskih patogena kad je patogen izložen na površini ćelije sa MHC I molekulima. Smatra se da oni imaju ulogu i u uklanjanju starih i oštećenih sekretornih ćelija u mlečnoj žlezdi. Supresorska funkcija Tc limfocita može biti aktivirana u inficiranoj mlečnoj žlezdi ili tokom peripartalnog perioda (Sordillo i Streicher, 2002).

Ćelije koje pripadaju populaciji  $\gamma, \delta$  T limfocita imaju primarnu funkciju u zaštiti epitela, ali imaju i citotoksičnu ulogu, te su zbog toga važne u zaštiti od bakterijske infekcije kod mastitisa. U sekretu mlečne žlezde, kao i u tkivu, zastupljen je veći procenat  $\gamma, \delta$  T ćelija u poređenju sa perifernom krvi. B limfociti proizvode

antitela protiv patogena i nakon aktivacije oni se diferentuju u plazma ćelije i ćelije pamćenja. Procenat B limfocita ostaje konstantan između stadijuma laktacije.

Imunoglobulini (Ig) su najznačajniji rastvorljivi humoralni faktori kod specifičnog imunskog odgovora koji povezuju različite elemente ćelijskog i humoralnog imunskog sistema i predstavljaju glavnu komponentu specifičnog imunskog sistema u kolostrumu i mleku. Oni sprečavaju adheziju mikroba za tkiva, inhibiraju metabolizam bakterija, aglutiniraju bakterije, obezbeđuju opsonizaciju i fagocitozu bakterija, ubijaju bakterije aktivacijom sistema komplemента i neutrališu toksine i viruse (Sordillo., 2005).

U kolostrumu, Ig čine 70-80% proteina (20-150 g/L), što je važno radi obezbeđenja pasivnog imuniteta novorođenih životinja, dok ih u mleku ima 1-2% (0,5-1g/L) od ukupnih proteina (Stelwagen i sar., 2009).

Tokom laktacije, koncentracija Ig u mleku varira i zavisi od njenog stadijuma, tako da je relativno niska tokom većeg dela laktacije, povećava se pri njenom kraju i tokom zasušenja, a svoj maksimum dostiže tokom kolostrogeneze. Koncentracija Ig u kolostrumu i mleku se povećava tokom inflamacije. Imunoglobulini u mleku mogu biti poreklom iz krvi ili sintetisani *in situ* od strane plazma ćelija aktiviranih antigenom, koji dolaze u mlečnu žlezdu iz krvi posredstvom hemokina koji su proizvedeni lokalno u toku intramamarne infekcije (Musoke i sar., 1986).

Mlečna žlezda ima aktivnu ulogu u regulaciji nivoa različitih Ig u kolostrumu i mleku, iako ih sam epitel mlečne žlezde ne sintetiše. Imunoglobulini iz krvi se transportuju u mlečnu žlezdu zahvaljujući specifičnim receptorima. Dominantna uloga u odbrani mlečne žlezde od bakterijskih patogena pripisuje se imunoglobulinima klase/podklase IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgM i IgA. Imunoglobulini IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, i IgM igraju ulogu u opsonizaciji i podstiču fagocitozu od strane neutrofilnih granulocita i makrofaga, dok IgA igra ulogu u neutralisanju toksina i aglutinaciji bakterija. Koncentracija imunoglobulina klase IgG<sub>1</sub>, IgA, i IgM u kolostrumu značajno prevazilazi njihovu koncentraciju u krvi. Odnos između koncentracija imunoglobulina u kolostrumu i krvi iznosi za IgG<sub>1</sub> 4:1, za IgA 13:1 i za IgM 2:1. Predominantni imunoglobulini u kolostrumu i mleku su IgG klase<sub>1</sub> dok se nivo IgG<sub>2</sub> značajno povećava tokom inflamacije.

### **Kordinacija nespecifičnog i specifičnog imunskog sistema tokom intramamarne infekcije**

Da bi se obezbedila optimalna odbrana od infekcije, mlečnoj žlezdi je potrebno zajedničko, kooperativno i složeno dejstvo nespecifičnog i specifičnog imunskog sistema. Kontakt bakterija sa leukocitima u mleku ili epitelnim ćelijama mlečne žlezde, udružen sa različitim virulentnim mehanizmima i oslobađanjem toksina, iritacijom ili čak oštećenjem epitela mlečne žlezde dovodi do aktivacije nespecifičnog imunskog odgovora. Produkti zapaljenja iz oštećenog epitela dovode do toga da lokalno prisutni leukociti i epitel zdrave mlečne žlezde otpuštaju hemoa-

traktante koji pokreću migraciju i nakupljanje imunskih ćelija, prvenstveno NG poreklom i iz koštane srži i cirkulacije koji prelaze u mlečnu žlezdu.

Proinflamatorni citokini (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17) kao i IL-8 i TNF- $\alpha$  su glavni efektori koji iniciraju inflamatorni odgovor na lokalnom i sistemskom nivou (Harad i sar., 1994). Ovi citokini, u kooperaciji sa TGF-CSF i hemotaktičnim faktorima (C3a, C5a - komponente komplemента, oksilipidi, kiseonički radikali, proteini akutne faze) pokreću migraciju NG u mlečnu žlezdu preko indukcije ekspresije vaskularnih endotelijalnih adhezivnih molekula (E i P selektini) pokreću time transendotelijalnu migraciju NG u inficirano tkivo. Kao posledica dejstva citokina povećana je ekspresija i adhezivnost drugih adhezivnih molekula neutrofila, kao što je Mac-1 integrin (CD11b/CD18), što omogućava neutrofilima da se tesno vežu za aktivirani endotel u saradnji sa drugim endotelijalnim adhezivnim molekulima, ICAM-1 (engl. „*Intercellular Adhesion Molecule 1*”). Migracija imunskih ćelija u mlečnu žlezdu nije slučajan proces i za regulaciju hemotakse je neophodna saradnja više molekula, hemoatraktanata, selektina i integrina. Leukociti koji migriraju, ekspimiraju veći broj receptora za Ig i komplement na svojoj površini i imaju veću sposobnost fagocitoze od onih u cirkulaciji (Sordillo, 2018).

Stimulacija baktericidne aktivnosti različitih leukocita lokalizovanih u inficiranoj mlečnoj žlezdi je uglavnom regulisana određenim proinflamatornim citokinima. Aktivacija neutrofila i njihova povećana funkcija su stimulisani preko IL-1, IL-8, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i G-CSF, makrofaga sa IL-12, M-CSF i GM-CSF, a NK limfocita sa IL-2 i IL-12 (Trinchieri, 2003).

Kao rezultat intramamarnе infekcije, dolazi do određenih sistemskih reakcija kao što su: febrilni odgovor, povećanje sinteze i sekrecije proteina akutne faze i porast nivoa kortizola u cirkulaciji, kao i povećane propustljivosti krvnih sudova (Sordillo, 2018).

Antigeni bakterija uzročnika mastitisa bivaju obrađeni od strane makrofaga i B limfocita i pojavljuju se na membrani zajedno sa MHC molekulima klase I i II i tada su prepoznati od strane različitih limfocita. Nakon prepoznavanja antigena vezanog za MHC II na B limfocitima ili makrofagima, aktiviraju se CD4+ T ćelije. U zavisnosti od citokina koji proizvode, Th ćelijski odgovor može pokrenuti ili ćelijski posredovan (Th1tip) ili humoralni (Th2 tip) imunski odgovor (Brown i sar., 1998).

Glavni citokini koje luče Th1 ćelije su IL-2 i IFN- $\gamma$  koji stimulišu ćelijski odgovor protiv intracelularnih patogena. Citokini IL-4, IL-5, IL-10 se luče od strane Th2 limfocita i oni pokreću humoralni imunitet a zajedno regulišu funkcije makrofaga i stimulišu proizvodnju njihovih citokina. Citotoksični CD8+ limfociti indukovani inflamacijom proizvode IFN- $\gamma$ , a regulatorni supresorski CD8+ limfociti stvaraju IL-4. Inflamatorni citokini proizvedeni od strane T limfocita indukuju proliferaciju i diferencijaciju B limfocita u plazma ćelije koje stvaraju antitela i u memorijske ćelije. Sinergistički aktivirani makrofagi otpuštaju hemotaktičke signale za neutofilne granulocite i time amplifikuju inflamatorni odgovor. Makrofagi stvaraju prostaglan-

dine i leukotrijene koji intenziviraju lokalni inflamatorni proces, kao i specifične citokine koji regulišu T ćelijsku diferencijaciju (IL-12).

Regulacija aktivacije Th ćelija u Th1 ili Th2 odgovor je glavna osovina u koju su uključeni neki regulatorni citokini (IL-4 i IL-12) (Mosmann i Coffman, 1989; Alnakip i sar., 2014).

U odgovoru na bakterije i bakterijske produkte dolazi do proizvodnje IL-12. On doprinosi imunskom odgovoru tako što favorizuje aktivnost CD4+ T ćelija prema Th1 odgovoru i povećava generisanje citotoksičnog IFN- $\gamma$  koga proizvode CD8+ T limfociti. Takođe igra ulogu faktora rasta za NK ćelije i indukuje njihovu citotoksičnu aktivnost. IL-12 utiče na proizvodnju IFN- $\gamma$  od strane limfocita i NK ćelija. IL-4, suprotno od IL-12, favorizuje razvoj Th2 populacije i ima inhibitorni efekat na proizvodnju IFN- $\gamma$ . U odnosu na antiinflamatorni IL-10, interleukin 4 ima manji efekat na sintezu monokina.

Regulacija intramamarne infekcije posredovana je povećanom ekspresijom većeg broja citokina – inflamatornih antagonista, uključujući IL-10 i TNF- $\beta$  i u anti-inflamatornim efektima koje izazvaju IL-6 i IL-4. IL-10 najviše doprinosi ovom procesu. Oni smanjuju nastanak svih tipova Th ćelija i smanjuju proizvodnju proinflamatornih citokina, hemokina i eikozanoida od strane monocita, makrofaga i neutrofilnih granulocita. IL-10 inhibira sposobnost makrofaga da stimulišu Th1 ćelije na proizvodnju citokina, uglavnom IFN- $\gamma$  i ima inhibitorni efekat na LPS indukovanu proizvodnju IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$  od strane makrofaga (Alnakip i sar., 2014). On ne inhibira proizvodnju citokina od strane B limfocita, niti utiče na mogućnost drugih fagocita da stimulišu proizvodnju citokina od strane Th2 ćelija. Slično IL-10, TNF- $\beta$  ima glavnu ulogu da suprimira imunski odgovor, iako ima i neke proinflamatorne osobine. Anti-inflamatorna uloga TNF- $\beta$  se ispoljava kroz: inhibiciju makrofaga da proizvode hemokine, proinflamatorne citokine, azot oksid i ROS, limitira proizvodnju IFN- $\gamma$ , stimuliše ekspresiju receptora antagonista IL-1 i povećava uklanjanje bakterija i ćelijskog detritusa od strane makrofaga (Ashcroft, 1999).

Regeneracija oštećenog epitela mlečne žlezde posredovana je uglavnom sa TNF- $\alpha$  koji stimuliše proliferaciju epitela i remodeliranje tkiva. Sa druge strane, TNF- $\beta$  promovise depoziciju ekstracelularnog matriksa, fibrozu i pojavu ožiljnog tkiva. Prema tome, obnavljanje zdrave strukture i formiranje ožiljaka je kontrolisano balansom između ova dva tipa TNF. Promenjene ćelije se uklanjaju od strane makrofaga i citotoksičnih Tc ćelija koje prepoznaju i eliminišu promenjene sopstvene ćelije preko prezentacije antigena, uz pomoć  $\gamma$ ,  $\delta$  T ćelija i NK ćelija, koji posreduju u citotoksičnosti preko MHC molekula (Riollet i sar., 2000).

### **Imunski odgovor mlečne žlezde na bakterije – uzročnike mastitisa**

Istraživanje imunskog odgovora mlečne žlezde na različite patogene može pomoći u boljem razumevanju prirode, razvoja i težine mastitisa koji oni uzrokuju. Osetljivost i imunski odgovor mlečne žlezde variraju značajno u zavisnosti od

vrste bakterija i njihovih toksina. Velika osetljivost mlečne žlezde na neke patogene - izazivače mastitisa rezultira snažnim imunskim odgovorom, izazivajući akutni odgovor na infekciju i predisponira brzo uklanjanje prodrlih patogena odgovarajućim imunskim odgovorom. Smanjena mogućnost uklanjanja određenih bakterija kao što su *Staph. aureus* i neke koagulaza-negativne stafilokoke (CNS) može dovesti do supkliničke ili hronične forme mastitisa kao rezultat oslabljenog odgovora imunskog sistema mlečne žlezde (Dervishi i sar., 2015).

Veći broj istraživanja je vršen u cilju ispitivanja imunskog odgovora mlečne žlezde prema različitim patogenima izazivačima mastitisa u cilju razumevanja patogeneze intramamarne infekcije (Alnakip i sar., 2014). Najveći broj se odnosio na imunski odgovor kod mastitisa izazvanog sa *Staph. aureus* i sa *E. coli*. Kod koliformnih mastitisa dolazi do akutnog inflamatornog odgovora usled prisustva LPS. Nespecifični imunski odgovor varira u zavisnosti od vrste uzročnika mastitisa. Snažan odgovor TNF- $\alpha$  na LPS ima centralno mesto u ranoj fazi - početku imunskog odgovora mlečne žlezde i u razvoju hipertermije, koja je u vezi sa koliformnim mastitisom, endotoksičnim šokom u perakutnoj formi, leukopenijom u perifernoj krvi i posledično povećanjem broja leukocita u mleku (Sordillo i Peel., 1992).

Hemotaksa i nakupljanje leukocita (prvenstveno NG) i velika proizvodnja različitih citokina (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-8) su odraz osetljivosti i odgovora mlečne žlezde na *E. coli* u poređenju sa *Staph. aureus*. Ovo objašnjava činjenicu zašto *E. coli* mastitis ima akutnu formu i zbog čega prolazi spontano u kratkom vremenskom periodu.

U zavisnosti od nivoa hemoatraktanata i proinflamatornih, inflamatornih i regulatornih citokina nespecifični imunski odgovor je takođe snažan prema *Kl. pneumoniae* i *Ps. aeruginosa* (Bannerman i sar., 2004).

Protiv bakterije *S. marcescens* imunski odgovor mlečne žlezde je relativno blag. Broj bakterija izolovanih iz mlečne žlezde sa *S. marcescens* inficiranih krava kao i SCC naglo opadaju 24h i 48h posle infekcije, što bi moglo ukazati na eliminaciju bakterije od strane imunskog sistema mlečne žlezde.

Nasuprot odgovoru imunskog sistema mlečne žlezde na *E. coli*, odgovor na *Staph. aureus* je nedovoljan da eliminiše bakterije i time se omogućava održavanje infekcije i eventualno dovodi do supkliničke ili hronične forme intramamarne infekcije. Neka istraživanja su dokazala da intramamarna infekcija izazvana sa *E. coli* ali ne i sa *Staph. aureus*, indukuje jaku ekspresiju gena za IL-8 i TNF- $\alpha$  u tkivu mlečne žlezde. Takođe nastaje jaka aktivacija NF- $\kappa$ B u epitelnim ćelijama mlečne žlezde i pokreće se brza rana ekspresija  $\beta$  defenzina, TLR2 i TLR4 u mlečnoj žlezdi i limfnim čvorovima, dok je neadekvatna proinflamatorna aktivacija i potpuni izostanak aktivacije NF- $\kappa$ B prisutan u epitelnim ćelijama mlečne žlezde izložene *Staph. aureus* ili LTA. Smanjena ekspresija i indukcija nekih inflamatornih citokina (TNF- $\alpha$  od strane LTA), neadekvatna aktivacija NF- $\kappa$ B i smanjena ekspresija i proizvodnja hemokina (IL-8 i RANTES - *Regulated upon Activation, Normal T-cell*

*Expressed, and Secreted*) uključenih u nakupljanje leukocita može objasniti zašto SCC nisu povećan u mlečnoj žlezdi izloženoj *Staph. aureus* dok je kod mlečne žlezde izložene *E.coli* to slučaj (Yang i sar., 2008).

Prema svemu sudeći, *Staph. aureus* modulira - menja imunski odgovor u cilju povećanja stepena preživljavanja. Smatra se da je ekspresija TNF- $\beta$  kod intramamarne infekcije sa *Staph. aureus* razlog promenjenog - umanjenog imunskog odgovora na ovaj patogen (Yang i sar., 2008) budući da on blokira TLR signal. Pored toga, različite studije su ukazale da stafilokokni enterotoksini igraju ulogu kao superantigeni aktivirajući specifične tipove T limfocita (uglavnom CD8+ supresore) i stimulišu otpuštanje specifičnih citokina. Prisustvo velikog broja supresorskih CD8+ u odnosu na CD4+ T ćelije značajno inhibira imunski odgovor limfocita i njihovo nakupljanje i uz nestabilnu ekspresiju i oslobađanje inflamatornih faktora (IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ ). Kompromitovana ekspresija i otpuštanje inflamatornih citokina (depresija IL-2 i nivoa C5a), nestabilno otpuštanje anti-inflamatornog IL-10 mogu predstavljati objašnjenje za supresivnu prirodu izazivača mastitisa *Staph. aureus*-a. Zbog toga najčešće ne dolazi do ozdravljenja već se javlja supklinička ili hronična forma bolesti sa perzistiranjem patogena.

Intramamarna infekcija izazvana sa CNS uglavnom ima supkliničku formu. Kod nje dolazi do povećanog broja SCC i ona može takođe perzistirati slično kao *Staph. aureus*.

Manji broj istraživanja je bio fokusiran na imunski odgovor mlečne žlezde protiv streptokoka, uprkos značajnom mestu koje zauzimaju kao izazivači mastitisa. Takođe je manji broj studija izveden radi ispitivanja imunskog odgovora mlečne žlezde prema *S. dysgalactiae* i *S. uberis* (Wellnitz i sar., 2012).

U jednom od istraživanja je utvrđeno povećanje ekspresije TLR 4 i različitih citokina (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) kod infekcije sa *S. dysgalactiae*. Takođe je dokazano da imunski odgovor mlečne žlezde protiv intramamarne infekcije izazvane sa *S. uberis* nije dovoljan da uspešno eliminiše bakterije, iako je utvrđena povećana ekspresija i proizvodnja nekoliko inflamatornih medijatora i antimikrobnih komponenti (IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , LPS-BP, C5a i LF). Broj bakterija u mleku i SCC ostaje povećan u dužem periodu posle infekcije u poređenju sa *Serratia marcescens*. Kod mlečne žlezde, inficirane sa *S. uberis*, ni nakupljanje neutrofila, ni fagocitoza od strane makrofaga ne rezultiraju efikasnim smanjenjem broja bakterija, već štaviše, intracelularna replikacija bakterija u makrofagima raste. Međutim, različiti sojevi *S. uberis* mogu pokrenuti različite imunske odgovore. Izgleda da patogeni faktori, pre nego faktori domaćina, imaju bitnu ulogu u modifikaciji imunskog odgovora mlečne žlezde. Patogenost koja je specifična za pojedine sojeve, značajno modifikuje imunski odgovor. Imunski odgovor mlečne žlezde prema različitim sojevima *S. uberis* je različit u zavisnosti od intenziteta infekcije. Ekspresija IL-1 $\beta$  i IL-8 od strane epitelinih ćelija mlečne žlezde u *in vitro* uslovima, je veća kod izlaganja živim i toplotom inaktiviranim *S. uberis* izolovanim od akutnog mastitisa nego od *S. uberis* hroničnog mastitisa (Alnakić i sar., 2014). Takođe je zanimljivo da je bilo relativno malo istraživanja o imunskom odgovoru mlečne

žlezde kod goveda prema *S. agalactiae*, koji je jedan od glavnih kontagioznih patogena uzročnika mastitisa.

### Zaključak

Poznavanje imunološkog statusa zdrave mlečne žlezde, kao i imunskog odgovora mlečne žlezde u uslovima zapaljenja, je bitno za razumevanje prirode intramamarnih infekcija izazvane specifičnim patogenima i značajno doprinosi razvoju efikasnih metoda za otkrivanje i kontrolu mastitisa. Strategije koje dovode do postizanja optimalnog imunskog odgovora mlečne žlezde mogu predstavljati efikasan način da se preveniraju nove infekcije mlečne žlezde i ograniči upotreba antibiotika, danas neophodnih u terapiji mastitisa.

Da bi se poboljšala otpornost prema infekcijama, dalja istraživanja imunologije mlečne žlezde moraju biti usmerena na: jačanje imunskih funkcija ili održavanje ovih funkcija na normalnom nivou tokom laktacije i perioda zasušenja, posebno u periodu imunosupresije; na pojašnjenje uloge specifičnih imunskih ćelija mlečne žlezde, pogotovo limfocita (NK ćelija i  $\gamma$ , $\delta$  T ćelija); na istraživanje imunskog odgovora mlečne žlezde na različite bakterije kod goveda (*S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae*, *E. coli* i CNS), budući da je u dosadašnjem periodu najviše istraživanja bilo fokusirano na infekcije izazvane sa *E. coli* i *Staph. aureus*.

**Napomena:** Ovaj rad je delimično finansiran sredstvima Projekta br. III 46002 i Projekta TR 31050 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja republike Srbije.

### Literatura

1. Addis MF, Bronzo V, Puggioni GMG, Cacciotto C, Tedde V, Pagnozzi D et al., Relationship between milk cathelicidin abundance and microbiologic culture in clinical mastitis, *J Dairy Sci*, 2017, 100, 4, 2944-53.
2. Aitken SL, Corl CM, Sordillo LM, Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution, *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2011, 16, 4, 291-304.
3. Akira S, Takeda K, Toll-like receptor signalling, *Nature Rev Immunol*, 2004, 4, 7, 499-511.
4. Alluwaimi AM, Cullor JS, Cytokines gene expression patterns of bovine milk during middle and late stages of lactation, *J Vet Med*, 2002, Series B, 49, 2, 105-10.
5. Alnaki ME, Quintela-Baluja M, Böhme K, Fernández I, Caamaño-Antelo S, Calo-Mata P et al., The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions, *J Vet Med*, 2014, 1-31.
6. Ashcroft GS, Bidirectional regulation of macrophage function by TGF- $\beta$ , *Microb Infect*, 1999, 1, 15, 1275-82.
7. Bannerman DD, Paape MJ, Hare WR, Hope JC, Characterization of the bovine innate immune response to intramammary infection with *Klebsiella pneumoniae*, *J Dairy Sci*, 2004, 87, 8, 2420 - 32.
8. Barber MR, Pantschenko AG, Hinckley LS, Yang TJ, Inducible and constitutive in vitro neutrophil chemokine expression by mammary epithelial and myoepithelial cells, *Clin Diag Lab Immunol*, 1999, 6, 6, 791- 98.



9. Brown WC, Rice-Ficht AC, Estes DM, Bovine type 1 and type 2 responses, *Vet Immunol Immunopathol*, 1998, 63, 1-2, 45 - 55.
10. Dervishi E, Zhang G, Hailemariam D, Dunn SM, Ametaj BN, Innate immunity and carbohydrate metabolism alterations precede occurrence of subclinical mastitis in transition dairy cows, *J Anim Sci Technol*, 2015, 23, 57, 46, 1-19.
11. Fox PF, Kelly AL, Indigenous enzymes in milk: overview and historical aspects - part 1, *Int Dairy J*, 2006,16, 6, 500 -16.
12. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K, Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation, *J Leuko Biol*, 1994, 56, 5, 559 - 64.
13. Kawai T, Akira S, The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors, *Nature Immunol*, 2010,11, 5, 373–84.
14. Lin Y, Xia L, Turner JD, Zhao X, Morphologic observation of neutrophil diapedesis across bovine mammary gland epithelium in vitro, *Am J Vet Res*, 1995, 56, 2, 203–7.
15. Mosmann TR, Coffman RL, TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties, *Ann Rev Immunol*, 1989, 7, 1, 145 - 73.
16. Musoke A, Rurangirwa F, Nantulya V, Biological properties of bovine immunoglobulins and systemic antibody responses, In: *The Ruminant Immune System Health and Disease*, Cambridge University Press, 1986, UK, 391–408.
17. Napel JT, de Haas Y, de Jong G, Lam TJGM, Ouweltjes W, Windig JJ, Characterization of distributions of somatic cell counts, *J Dairy Sci*, 2009, 92, 3, 1253–64.
18. Paulrud CO, Basic concepts of the bovine teat canal, *Vet Res Comm*, 2005, 29, 3, 215-45.
19. Porcherie A, Cunha P, Trotureau A, Roussel P, Gilbert FB, Rainard P, Germon P, Repertoire of *Escherichia coli* agonists sensed by innate immunity receptors of the bovine udder and mammary epithelial cells, *Vet Res*, 2012, 43, 1, 14.
20. Priyadarshini S, Kansal VK, Lysozyme activity in buffalo milk: effect of lactation period, parity, mastitis, season in India, pH and milk processing heat treatment, *Asian-Australasian J Anim Sci*, 2002, 15, 6, 895–9.
21. Riollot C, Rainard P, Poutrel B, Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland, *Adv in Exp Med Biol*, 2000, 480, 247–58.
22. Sordillo, LM, Mammary gland immunobiology and resistance to mastitis, *Vet Clin Food Anim*, 2018, 34, 507–23.
23. Sordillo LM, Peel J, Effect of interferon-gamma on the production of tumor necrosis factor during acute *Escherichia coli* mastitis, *J Dairy Sci*, 1992,75, 8, 2119–25.
24. Sordillo LM, Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility, *Livestock Prod Sci*, 2005, 98, 1-2, 89–99.
25. Sordillo LM, Streicher KL, Mammary gland immunity and mastitis susceptibility, *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2002, 7, 2, 135–46.
26. Stelwagen K, Carpenter E, Haigh B, Hodgkinson A, Wheeler TT, Immune components of bovine colostrum and milk, *J Anim Sci*, 2009, 87, 3, 3–9.
27. Trinchieri G, Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity, *Nature Rev Immunol*, 2003, 3, 2, 133–46.
28. Wellnitz O, Berger U, Schaeren W, Bruckmaier RM, Mastitis severity induced by two *Streptococcus uberis* strains is reflected by the mammary immune response in vitro, *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, 2012, 154, 8, 317–23.
29. Yang W, Zerbe H, Petzl W. et al., Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF- $\kappa$ B in mammary epithelial cells and to quickly induce TNF $\alpha$  and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder, *Mol Immunol*, 2008, 45, 5, 1385–97.