

DOI: 10.7251/VETJ1701016L

UDK: 615.33.015.8:[619:616.993

Miodrag Lazarević, Aleksandar Milovanović¹

Pregledni rad

PRIMENA POJEDINIH IMUNOSTIMULATORA U VETERINARSKOJ MEDICINI

Kratak sadržaj

U ovom revijalnom radu su izneta savremena shvatanja mehanizama delovanja, uloga i mogućnosti primene imunostimulatornih supstanci u veterinarskoj medicini. Imunofarmakologija je ne tako nova grana farmakologije, nastala iz sve očiglednije potrebe da se lekovima i drugim prepratima utiče na funkcije imunskog sistema, kako ljudi tako i životinja. U veterinarskoj medicini imunostimulatori imaju poseban značaj zbog toga što postoji stalna potreba za zaštitom zdravlja životinja u uslovima intenzivne proizvodnje. Jedan od najvećih problema u primeni imunomodulatornih supstanci leži u činjenici da jedna te ista supstancija, u zavisnosti od načina i režima doziranja, može delovati immunosupresivno ili imunostimulatorno. Ovi efekti zavise i od trenutnog funkcionalnog stanja imunskog sistema samog pacijenta. Osim prikaza literaturnih podataka, izneta su i sopstvena iskustva autora proizašla iz brojnih laboratorijskih ispitivanja i oglada na farmama. Ona se pre svega odnose na primenu manan-oligosaharida u povećanju stepena resorpcije kolostralnih imunoglobulina kod teladi i prasadu, primenu manan-oligosaharida u terapiji puerperalne disgalaksije krmača, primenu ekstrakta goveđeg timusa kod pacova sa immunosupresijom izazvanom jonizujućim zracima, primenu ekstrakta zida *Mycobacterium phlei* (*Mcb. phlei*) u poboljšanju reproduktivnih rezultata krmača, primenu ekstrakta ostriga u terapiji endometritisa krava i primenu visokih doza vitamina C u terapiji subkliničkih oblika mastitisa mlečnih krava. Takođe je opisana i imunomodulatorna uloga antihelmintika levamizola ispitana na modelu eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa pacova kao i uticaj ekstrakta kukureka (*Helleborus odoratus* Waldst et Kit) na nespecifične odbrambene mehanizme pacova.

Ključne reči: antibiotici, domaće životinje, imunostimulacija

¹ Dr Miodrag Lazarević, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Srbija; Dr Aleksandar Milovanović, naučni saradnik. Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad, Srbija Kontakt adresa: lazarevicm@vet.bg.ac.rs

DOI: 10.7251/VETJ1701016L

UDK: 615.33.015.8:[619:616.993

Miodrag Lazarevic, Aleksandar Milovanovic¹

Review paper

APPLICATION OF SOME IMMUNOSTIMULATORS IN VETERINARY MEDICINE

Summary

This review article deals with the contemporary understanding of the action mechanisms, roles and possibilities for immunostimulatory substances usage in the veterinary medicine. Immunopharmacology is not that new branch of pharmacology, raised from the obvious need to influence functions of the immune system both in humans and animals by medicaments or other substances. In veterinary medicine immunostimulants are of special significance because there is a permanent need for animal's health protection under conditions of intensive production. Immunostimulants achieved a special significance since the total ban of antibiotics usage as growth stimulators resulting in reduced health protection, especially in the intensive production. One of the major problems regarding immunomodulators lays in the fact that the same drug, depending on the regime and dose, may exert both immunosuppressive and immunostimulatory effects. These effects are also dependent on the current status of the immune system functions of the particular patient. In addition to the literature data, we present our own experiences raised from the numerous laboratory investigations and field trials. This accomplish usage of mannan-oligosacharides in enhancing degree of absorption of colostral immunoglobulins in calves and piglets, application of the bovine thymic extract in irradiated immunosuppressed rats, usage of the mannan-oligosacharides in the therapy of puerperal dysgalactia in sows, usage of *Mcb. phlei* cell wall extract in improving reproductive results in sows, usage of the oyster extract in the therapy of cows endometritis and application of the high vitamin C doses in the therapy of subclinical mastites in dairy cows. Immunomodulatory effects of anthelmintic drug, Levamisole, in the model of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis of rats are described as well. In addition, we have investigated effects of *Helleborus odoratus* (Waldst et Kit) extracts on innate defense mechanisms in rats.

Key words: antibiotics, domestic animals, immunostimulation

¹ Full Professor Miodrag Lazarevic, DVM, PhD, Faculty of Veterinary Medicine University of Belgrade, Belgrade, Serbia; Research Assistant Dr. Aleksandar Milovanovic, Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Novi Sad, Serbia.

UVOD

Neprimerena i nekritična upotreba antibiotika kao stimulatora rasta u uzgoju domaćih životinja je trajala nekoliko decenija i na kraju dovela do nastanka brojnih rezistentnih i multirezistentnih bakterijskih sojeva što je ozbiljno ugrozilo zdravlje ljudi i u izvesnoj meri samih životinja, onemogućavajući efikasnu terapiju. Kako su dokazi za ovo bili više nego evidentni, u Evropi je 1. januara 2006, godine stupila na snagu potpuna zabrana upotrebe antibiotskih supstanci u ove svrhe. Takođe je ograničena i terapijska peroralna primena antibiotika kod životinja čije se meso i proizvodi koriste u ishrani ljudi. Zanimljivo je da se praktično nije ni znalo kojim mehanizmom antibiotici stimulišu rast i od uopštenog тумачења да су животинје биле мање болесне, односно више здраве, па су због тога и прозводни резултати бољи није се далеко одмакло. U nekoliko istraživanja je dokazano da primena pojedinih antibiotika može da dovede do porasta visine i ukupne površine crevnih resica ali ovi dokazi nisu bili sasvim ubedljivi. Sada se čini da tom fenomenu nije ni posvećivana potrebna pažnja jer je profit bio uvećan, a sve do pojave problema sa bakterijskom rezistencijom mislilo se da ni nema nekih negativnih posledica.

Zabrana upotrebe antibiotika kao stimulatora rasta u stočarskoj proizvodnji nametnula je potrebu za hitnim iznalaženjem alternativnih rešenja sa ciljem da se pre svega utiče na imunski sistem životinja kako bi se povećao nivo zdravstvene zaštite jedinki. Ovo je posebno značajno u

uslovima intenzivne proizvodnje kada se od njih očekuju intenzivan rast, ekonomski opravdan stepen konverzije hrane i visoka proizvodnja. Zbog toga se poslednjih godina u nauci velika pažnja posvećuje ispitivanju mehanizama delovanja, ulogama i mogućnosti primene imunostimulativnih supstanci u stočarstvu i veterinarskoj medicini. Posebno su značajna ispitivanja u oblasti terapije pojedinih oboljenja životinja supstancama koje ne dovode do pojave rezistencije. Iskustva stečena u veterinarskoj mogu svakako biti dragocena i u humanoj medicini.

U medicinskim naukama, imunomodulacija je oblast u kojoj se vrše obimna istraživanja sa ciljem da se razviju metode radi povećanja otpornosti na bolesti optimalnom regulacijom funkcija imunskog sistema. Većina infektivnih bolesti ljudi i životinja se još uvek može kontrolisati antibioticima i vakcinama, ali se usled nastanka bakterijske rezistencije, intenzivno traga za novim profilaktičkim i terapijskim strategijama. Posebnu teškoću u borbi sa infektivnim bolestima predstavljaju sve intenzivniji međunarodni saobraćaj, globalizacija i promene navika u ishrani (Dhama i sar. 2015). Prema nekim pesimističkim prognozama smatra se da posle 2020. godine antibiotici praktično neće više biti efikasni (Hancock i Sahl, 2006, Dhama i sar. 2013). U veterinarskoj medicini se pod imunomodulacijom podrazumeva sposobnost da se reguliše imunski odgovor radi povećanja otpornosti na infektivne agense i radi povećanja proizvodnih sposobnosti (Zhao i sar. 2012). Stimulacija imunskog se koristi da se spreči pojava zaraznih bo-

lesti vakcinacijom, pre svega humoralnim imunitetom ili da se kod već postojećih infekcija imunski odgovor preusmeri ka celularnom tipu reakcija. Ona takođe obuhvata i borbu protiv tumora primenom citokina, antititela specifičnih za tumorske ćelije ili limfocita koji ove ćelije prepoznaju. Imunosupresija se koristi pri lečenju alergija, autoimunih bolesti ili pri transplantaciji tkiva ili organa (Dhama i sar 2015). Isti autori navode osnovne ciljeve koje treba da ispune imomodulatorne supstance: da aktiviraju snažan imunski odgovor ili da prolongiraju već postojeći protiv infektivnog uzročnika bolesti; da ubrzaju sazrevanje nespecifičnih ili specifičnih imunskih mehanizama u neonatalnom periodu kod mladih i osetljivijih jedinki; da osnaže lokalne odbrambene mehanizme na posebno osetljivim mestima kao što su mlečna žlezda visoko mlečnih krava ili digestivni trakt mladih preživara; da umanje negativne efekte stresa i zagađenja životne okoline na imunitet; da pojačaju i produže imunski odgovor posle vakcinacije i da stimulišu imunološki nadzor. Autori takođe navode i karakteristike idealnih imunomodulata. Oni treba: da se relativno brzo izlučuju iz organizma i da ne ostavljaju rezidue u tkivima; da stimulišu pecificni i nespecificni imunski odgovor; da imaju adjuvantni efekat ako se aplikuju zajedno sa vakcinom; da zadrže aktivnost kada se aplikuju *per os* i da budu stabilni nakon dodavanja u hraniva ili vodu za piće; da budu kompatibilni sa drugim lekovima kao što su antibiotici i antihelmintici; da pojačavaju primarni i sekundarni imunski odgovor na infektivne agense; da imaju defini-

san hemijski sastav i biološku aktivnost; da ne budu skupi; da ne budu toksični ni u većim dozama; da nemaju antigenska ni pirogena svojstva; da ne budu teratogeni niti kancerogeni i da se ne izlučuju mlekom ili preko jaja. Kao zaključak se u ovom radu navodi da modifikacije imunskog odgovora mogu da imaju sledeća tri cilja: da se on stimuliše ili suprimira kod normalnih jedinki ili da mu se povrate funkcije kod imuno-suprimiranih. Lako se može uvideti da su uslovi koje treba da ispunjava idealni imunostimulator brojni i da praktično nije ni moguće doći do supstance koja ih potpuno ispunjava.

Postoji nekoliko načina klasifikacije imunomodulata na osnovu njihovog porekla i načina primene. Jednu od najnovijih i najdetaljnijih podela iznose Dhama i sar. (2015). Oni su ove supstance podelili na sledeće grupe: 1. Fiziološki produkti (neuroendokrini hormoni, produkti timusa, citokini, glukokortikosterodi, antimikrobni peptidi) 2. Mikrobni proizvodi (izolati poreklom od *Mycobacterium* vrsta, *Propionibacterium* vrsta, stafilokoka, brucela, bordetela, Termofilnih bakterija, Lipoplisaharidi Gram-negativnih bakterija, probiotici i prebiotici) 3. Sintetski hemijski agensi (levamizol, tiabendazol, avidin, glukani, indomethacin, talidomid, ciklosporini) 4. Biljni proizvodi (ekstrakti Aloe, kukureka, ginka) 5. Adjuvansi za vakcine 6. Dodaci hrani (vitamini – D, E, C, B₆ i B₁₂, mikroelementi – Se, Zn, Fe, Cu, J, polisaharidi – β-D-glukani i α-D-manani) i 7. Helminti i njihovi produkti. Na kraju se navode i neka nespecificna dejstva pojedinih vakcina na tumorske ćelije. Posebnu grupu imunomodula-

tora predstavljaju i neki proizvodi dobijeni iz mleka, gruševine, loja, urina i balege zebu govečeta koji se već vekovima koriste u Indiji tako da se ova terapija naziva još i kravljom terapijom (engl. *cowtherapy* – *cowpathy*). Pojedini ekstrakti iz ovih proizvoda su patentirani i prodaju se kao pomoćna lekovita sredstva.

Day i Schultz (2014) ističu da postoji veliki broj komercijalnih, registrovanih imunosupresora koji se koriste u terapiji, dok je broj imunostimulatora relativno mali i uglavnom se radi o biljnim ili bakterijskim ekstraktima, a da pri tome nema jasnih i ubedljivih dokaza o njihovom uticaju na imunske funkcije. Od komercijalnih preparata oni navode: Immunoregulin (dobijen iz *Propionibacterium acnes*), Regressin V (dobijen od mikobakterija), Staphoid AB (sadrži ekstrakt zida bakterije *Staphylococcus aureus* zajedno sa inaktivisanim toksinima A i B), Staphage lizat (nastao liziranjem *S. aureus*), muramil tripeptid u lipozomima (dobijen od zida mikobakterija) kao i preparate poreklom od gljivice *Serratia marcescens*. Dokazano je da preparati poreklom od mikobakterija stimulišu Th1 odgovor i da mogu, u nekim alergijskim stanjima, kao što je atopijski dermatitis pasa, da preusmere Th2 alergijski odgovor ka manje štetnom Th1 odgovoru uz evidentno kliničko poboljšanje. Isti autori navode da je u Evropi jedini zvanično registrovani imunostimulatorni preparat Baypamune® (sad Zylexis®) koji se dobija inaktivacijom Parapox virusa ovaca. Navodi se i da bakterijski i biljni ekstrakti utiču na sintezu i sekreciju mešavine većeg broja citokina što je bliže realnom stanju stva-

ri u organizmu jer ćelije imunskog sistema na taj način i odgovaraju na različite antigene.

U tekstu koji sledi biće izneta neka naša iskustva i rezultati dobijeni višegodišnjim ispitivanjima različitih imunomodulatora u oblasti veterinarske medicine. Osim toga, prikazali smo i relevantne literaturne podatke pojedinačno za svaku od ispitivanih supstanci.

PRIMENA MANAN- -OLIGOSAHARIDA (MOS) KAO IMUNOSTIMULATORA

Manan-oligosaharidi (MOS) su prebiotici koji mogu da spreče adheziju bakterija za mukoza zida creva i da neutrališu bakterijske toksine, a da pri tome ne oštete tkiva (Spring i sar., 2000). Zbog toga se ova jedinjenja, koja se mogu izolovati iz zida kvasaca, već više od 20 godina koriste kao dodaci stočnoj hrani. Osim toga, oni ispoljavaju pozitivan uticaj na životinje selektivnom stimulacijom rasta i aktivnosti apatogene (korisne) mikroflore digestivnog trakta. Sistemski pozitivni efekti MOS preparata se pripisuju dodatnoj resorpciji proizvoda fermentacije nastalih delovanjem korisnih bakterija i poboljšavanjem zdravstvenog statusa domaćina (Sims i sar. 2004).

Mi smo utvrdili da dodavanje manan-oligosaharida kolostrumu krava (5 g/L) pre napajanja ima za posledicu značajan porast resorpcije kolostralnih IgG kod neonatalne teladi (Lazarević 2003, 2005., Lazarević i sar., 2010, Šabanović 2005). Do sličnih rezultata su došli i Hengartner i sar. (2005). Titar anti BHV-1 an-

titela je nakon 24 sata po rođenju i posle 7 dana bio značajno veći u ogleđnoj grupi teladi u poređenju sa vrednostima registrovanim u kontrolnoj grupi (Šabanović 2005). Na ovaj način je dokazano da se MOS preparati mogu svrstati u imunomodulatorne supstance jer dovode do poboljšanja prirodnog pasivnog imuniteta. Isti rezultat je potvrđen u brojnim ogleđima kod prasadi kojoj je tokom prvog dana života peroralno aplikovano 10 mL suspenzije MOS preparata (75g/L u fiziološkom rastvoru) (Lazarević i sar. 2010, Tokić 2011). Takođe smo ispitivali i mogućnost primene MOS preparata u tretmanu puerperalnog endometritisa krmača. Preparat (Yeast Call Wall, Alltech, Fermin, Senta) je aplikovan kateterom u uterus u količinama od 5, 10 i 20 g suspendovan u 100 mL fiziološkog rastvora. U ovoj studiji nisu praćeni imunološki parametri ali je registrovano značajno kliničko poboljšanje kod tretiranih krmača kao i veći dnevni prirasti prasadi (Lazarević i sar. 2012, Miljas 2013). Najvažniji rezultat postignut ovim poslednjim ispitivanjima je sprećavanje negativnih posledica bakterijske infekcije preparatom koji ne spada u grupu antibiotika pa prema tome ne postoji ni mogućnost nastanka bakterijske rezistencije.

UTICAJ EKSTRAKTA GOVEĐEG TIMUSA NA IMUNSKI ODGOVOR OZRAĆENIH PACOVA

Pojedini sastojci ekstrakta goveđeg timusa imaju imunomodulatorna svojstva i mogu, kod ljudi i životinja, sa suprimiranim funkcijama imunskog siste-

ma (humoralnim i/ili celularnim) dovesti do imunostimulacije. Opisivanje ovih efekata prevazilazi obim ovog rada tako da ćemo na ovom mestu izneti samo rezultate naše istraživaćke grupe. Jovanović i saradnici (2006) i Jovanović (2007) iznose rezultate ispitivanja efekata preparata Thymex-L (THYMOORGAN-GmbH PHARMAZIE &Co. KG, Germany) dobijenog iz ekstrakta goveđeg timusa na parametre humoralnog imunskog odgovora pacova kod kojih je prethodno izvršeno jednokratno ozraćivanje X zracima u dozi od 4 ili 6 Gy. U ovim studijama određivani su sledeći parametri: koncentracija interleukina 2 (IL-2), interferona γ (IFN- γ), koncentracija antitela posle vakcinacije i revakcinacije tetanusnim toksoidom (ATTx) i stepen kožne preosetljivosti na biljni mitogen PHA (engl. *phytohaemagglutinine*). Ispitivani ekstrakt je ispoljio pozitivan efekat na koncentraciju IL-2 i IFN- u serumu ozraćenih pacova. Ovaj pozitivan efekat je, kod grupe pacova koja je primila nižu dozu zraćenja, vidljiv već nakon 7. dana eksperimenta, dok je kod pacova ozraćenih višom dozom pozitivan efekat registrovan 21. dana eksperimenta. Pri proceni stepena reakcije kožne preosetljivosti na PHA, registrovan je pozitivan efekat primenjenog ekstrakta timusa i on je bio izraćeniji kod jedinki kod kojih je bila primenjena niža doza zraćenja. Ispitivani ekstrakt goveđeg timusa je ispoljio pozitivan efekat i na koncentraciju ATTx i to već 14. dana eksperimenta.

PRIMENA EKSTRAKTA BAKTERIJSKOG ZIDA *MYCOBACTERIUM PHLEI* KAO IMUNOMODULATORA

Filion i saradnici (1999) opisuju mogućnost upotrebe ekstrakta ćelijskog zida *M. Phlei* u inhibiciji rasta karcinoma mokraćne bešike kod ljudi i miševa. Mehanizam dejstva nije u potpunosti rasvetljen, a autori smatraju da je antikancerogeni efekat ostvaren direktnim efektom na proliferaciju i preživljavanje kancerogenih ćelija i indirektno, proizvodnjom interleukina 12 (IL-12), citokina koji ispoljava aktivnost protiv ćelija raka. Rezultati njihovih ispitivanja opravdavaju upotrebu MCC (*Mycobacterial cell complex*) u terapiji karcinoma mokraćne bešike zbog direktne inhibicije ćelijske proliferacije indukcijom apoptoze i indirektnom anti-kancerogenom stimulacijom infiltracije makrofaga/monocita i sinteze IL 12. Bagnu i sar. (2012) su takođe ustanovili da je MCWE (*Mycobacterium cell wall extract*) dovoljan za antitumorsku aktivnost i da frakcija ćelijskog zida bogata proteinima dovodi do aktivacije faktora nekroze tumora (TNF- α) kao i interleukina IL-12.

Primena ekstrakta ćelijskog zida *M. phlei* kao imunomodulatora, bila je predmet istraživanja i u reprodukciji domaćih životinja pa su Christofersen i sar. (2012), u svojoj studiji ispitivali efekte imunomodulatorne terapije glukokortikosteroidima i ekstraktom MCW na gensku ekspresiju pro i anti inflamatornih citokina, interleukina (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α ,

IL-1 receptor antagonista, proteina akutne faze i serumskog amiloida) u endometriju kobilica kod kojih je izazvan infektivni endometritis inokulacijom *E. coli*. Rogan i sar. (2007) su opisali uspešnu primenu imunomodulatora MCWE u terapiji endometritisa kobilica veštački izazvanih bakterijom *Streptococcus zooepidemicus*. Ispitivanjem imunoloških parametara i imunomodulatornih efekata ekstrakta MCWE bavili su se i Fumuso i sar. (2007). U grupi kobilica, posle tretmana sa MCWE, utvrđen je značajno viši nivo IL-10 ($p < 0,05$). Fumuso i sar. (2003), su ispitivali endometrijalnu ekspresiju mRNA pro-inflamatornih citokina IL-1 β , IL-6, TNF- α kod kobilica otpornih i sklonih perzistentnom post inseminacionom endometritisu. Kao imunomodulator su koristili MCWE aplikovan u vreme osemenjavanja i dokazali značajan uticaj aplikacije MCWE na ekspresiju IL-1. Autori smatraju da imunomodulatorni efekat MCWE može značajno da pomogne u obnavljanju homeostatskih lokalnih inflamatornih mehanizama u materici i preventivi post inseminacionih endometritisa kobilica. Risvanli (2011) je takođe proučavao problematiku idiopatskih endometritisa kobilica sa imunološkog aspekta naglašavajući upotrebu imunoterapeutika kao moguće praktično rešenje problema.

O upotrebi MCWE kao imunoterapeutika kod svinja izveštavaju Vezina i saradnici (1997) navodeći da MCWE sadrži trehalozu dimikolat i muramil dipeptid koji imaju imunomodulatorna svojstva. Autori su ispitivali *in vitro* efekat MCWE na blastogenu aktivnost perifernih limfocita prasadi uzrasta 6–8 nedelja posle stimu-

lacije mitogenima fitohemaglutininom (PHA) i konkanavalinom A (ConA). Ukupni rezultati ukazuju da MCWE može da stimuliše funkcionalnu aktivnost limfocita i ekspresiju mRNA za citokine kod 6–8 nedelja stare prasadi svinja što nagoveštava njegovu potencijalnu upotrebu kao kliničkog imuno terapijskog agensa.

Bray i sar. (2004), navode da je rani embrionalni mortalitet najvažniji faktor koji limitira veličinu legla i utiče na profitabilnost u proizvodnji svinja i da uspešan graviditet zahteva imunološki receptivan reproduktivni trakt kao odgovor na ekspoziciju imunomodulatornih faktora poreklom iz semene plazme. Imajuči ovo u vidu (Vasiljević, 2015) je u jednoj veoma opsežnoj studiji dokazala da je osemenjavanje krmača meleza Jorkšir x Landras, semenom nerasta rase Durok sa dodatkom ekstrakta ćelijskog zida *Mycobacterium phlei* (Bioniche Animal Health, Canada), imalo za posledicu statistički značajno povećanje broja oprasene i živo oprasene prasadi kada se posmatraju sve krmače zbirno kao i kod plotkinja sa paritetom od 2 do 5, ali ne i kod onih sa paritetom od 6 do 9. U grupi krmača osemenjanih ejakulatom nerasta sa ekstraktom ćelijskog zida *Mycobacterium phlei* koncepcija je iznosila 100 % dok je u kontrolnoj grupi vrednost ovog parametra bila 90 %. Krmače osemenjavane semenom nerasta rase Durok sa dodatkom ekstrakta ćelijskog zida *Mycobacterium phlei* imale su teža legla i ova razlika je bila veoma visoko signifikantna ($p < 0,001$). Ovaj stepen razlike je uočen u svim grupama plotkinja (sve krmače zbirno, paritet 2–5 i paritet 6–9). Prasad krmača osemenja-

vanih semenom nerasta rase Durok sa dodatkom ekstrakta ćelijskog zida *Mycobacterium phlei* su bila teža i ova razlika je bila veoma visoko signifikantna ($p < 0,001$), kada se posmatraju sve plotkinje zbirno. U grupama sa paritetom od 2 do 5 i 6 do 9, razlike su bile visoko signifikantne ($p < 0,01$). U okviru ove studije je detaljno proučavan i uticaj ekstrakta ćelijskog zida *Mycobacterium phlei* na parametre kvaliteta nerastova rase Durok i nusu zapaženi negativni efekti. Njegova primena pri VO krmača imala je za posledicu povećanje procenta koncepcije, broja ukupno i živo oprasene prasadi, težine legla i pojedinačne težine prasadi.

ALTERNATIVNI PRISTUP TERAPIJI ENDOMETRITISA KRAVA I KRMAČA INTRAUTERINIM IMUNO MODULATORIMA

U veterinarskoj praksi se za tretman endometritisa krava bakterijske etiologije uglavnom koriste antibiotici, antiseptici i hormoni. Kao što je već istaknuto, loša strana primene antibiotika je moguća bakterijska rezistencija uz visoke troškove lečenja i slabljenje odbrambenih mehanizama materice. Nedostatak primene antiseptika je u nekim slučajevima nekroza tkiva sa dužim periodom oporavka (Zemjanis, 1980).

Posebnu pažnju istraživača koji su primenjivali alternativne metode u terapiji endometritisa krava sa asimptomatskim sterilitetom privukli su glikogen ostriga, autologna krvna plazma i bakterijski lipo polisaharidi. Međutim, do sada, ovaj me-

tod nije našao širu primenu u praksi. Prvi rad o intrauterioj terapiji ovog oboljenja objavio je Asbury, 1984. godine koji navodi da kliničku indikaciju predstavljaju slučajevi bez posebne bakteriološke etiologije endometritisa, a takođe i potreba za prevencijom rekurentnih endometritisa kobilu sklonih infekcijama materice posle pripusta. Ovaj autor navodi pozitivne efekte posle upotrebe homologne ili heterologne krvne plazme. Suština delovanja krvne plazme je opsonizacija mikroorganizama pomoću komponenata sistema komplementa (Asbury i Lyle, 1993). Uspeh tretmana endometritisa krvnom plazmom podržava i *in vitro* opservaciju da su opsonini iz seruma, pogotovo komponente sistema komplementa, bitan faktor u stimulaciji fagocitoze. Tretman kobilu intrauterinom infuzijom plazme bio je zasnovan na pretpostavci da je subfertilitet bio uzrokovan nedovoljnom koncentracijom komponenata sistema komplementa i da je krvna plazma uvek obilan izvor svih opsonina. Watson i Stokes (1987), navode da sekret materice kobilu sklonih endometritisu slabije stimuliše fagocitozu u odnosu na sekret dobijen od kobilu otpornih na endometritis. Håkansson i sar. (1993) su zaključili da komponente sistema komplementa znatno doprinose opsonizujućoj aktivnosti sekreta materice kobilu i pre nastanka inflamatornog odgovora u ovom organu.

Postoje podaci da je za intrauterinu infuziju korišćen i LPS (lipopolisaharid) *E. coli* u cilju povećanja influksa neutrofilnih granulocita u lumen materice kobilu (Williamson i sar., 1987) i krava (Hussain i Daniel, 1991.).

Pascoe (1995.) navodi da je za jednokratnu intrauterinu aplikaciju krvne plazme zajedno sa antibioticima, optimalni termin 12–36 sati nakon pripusta čime se znatno poboljšava koncepcija kako kod kobilu u laktaciji, tako i kod problematičnih kobilu. Koncepcija je nakon terapije bila gotovo istovetna kao kod pripusta virgilnih omica. Pretpostavljeni mehanizam delovanja navedene terapije zasnovan je tome što je krvna plazma izvor svežih opsonina koji pojačavaju hemotaksu i fagocitozu polimorfonuklearnih leukocita (PMNL). Povećanjem zapremine uterusa tokom tretmana toksini se razređuju, a dodavanjem antibiotika se uništavaju preostale bakterije.

Singh i sar. (2003) su koristili LPS *E. coli* rastvoren u sterilnom PBSu i aplikovali ga u materice 12 krava u toku estrusa, dok je kontrolna grupa od 12 krava dobila čist pufer (PBS). Sve krave su imale nalaze asimptomatskog steriliteta uz pozitivne bakteriološke nalaze. Već nakon 6 sati od infuzije došlo je do stotrukog povećanja broja ćelija u ispirku, pri čemu je 80% ćelija pripadalo neutrofilnim granulocitima. Visok broj neutrofilnih granulocita dijagnostikovao je i nakon 72 časa od aplikacije. Nakon ovog tretmana je 8 od 12 krava ostalo steono u ogleđnoj grupi, dok je u kontrolnoj grupi samo jedna plotkinja ostala steona. Autor navodi da je mehanizam pojačanog „priliva“ neutrofilnih granulocita verovatno posledica kombinovanog dejstva vazodilatacije, hemoatraktanata i povećane proizvodnje interleukina-1, interleukina-8 i drugih faktora koje luče granulociti i makrofagi ćelije kao što navodi Tizard (1996). Singh i

sar. (2003) navode da pri hroničnim bakterijskim infekcijama verovatno postoje inhibitori koji destimulišu odbrambenu ulogu materice jer je u ispicima materica od ovakvih plotkinja ustanovljen nizak broj ukupnih leukocita. Jedan od razloga može biti činjenica da postojeće bakterije nisu dovoljan podražaj za obilniju infiltraciju ili da postojeći PMNL brzo degenerišu. Neuspeh imunostimulatorne terapije kod pojedinih grla može se pripisati i sposobnosti nekih bakterija da prežive u fagozomu PMNL (Tizard, 1996). Takođe, hronična infekcija može dovesti do uništenja endometrijuma, što slabi odbrambenu moć materice i onemogućava nida-ciju embriona.

Singh i sar. (2003) su koristili i glikogen ostriga u terapiji endometritisa bakterijske etiologije. Ogljedna grupa od 12 krava je dobijala 500 mg glikogena ostriga rastvorenog u 50 mL sterilnog fosfatnog pufera na dan estrusa. Dvanaest krava (kontrolna grupa) je dobilo samo rastvor fosfatnog pufera. Oko 80% ćelijske populacije ispirka materice pripadalo je PMNL (65% bile su žive ćelije, sa prosečnom fagocitozom od 5 bakterija). Povišeno prisustvo neutrofilnih granulocita u materici dokazano je tokom 72 sata nakon infuzije. Bakterijski negativni izolati kao i steonost nakon prvog osemenjavanja registrovani su u 66,67% slučajeva (8/12 u oglednoj grupi) i 8,33% (1/12 u kontrolnoj grupi).

Istovetan odgovor u masovnom privlivanju PMNL leukocita u lumen materice zdravih krava postignut je sa koncentracijama glikogena ostriga koje su varirale

između 0,1 i 10%, rastvorenih u 60 mL puferizovanog fosfatnog rastvora. Maksimalna vrednost broja PMNL zabeležena je 12 sati nakon administracije, sa čistom populacijom od 90% PMNL (Anderson i sar., 1985).

U prilog tezi da je u odbrani materice, vimena i drugih upalnih mesta bitan i broj prisutnih PMNL na mestu infekcije govore eksperimenti o infekcijama mlečne žlezde sa *Staph. aureus*. Paape i sar. (1981) su u *in vivo* eksperimentima dokazali da se ne može izazvati infekcija mlečne žlezde sa 23,8 do 115,0 CFU *Staph. aureus* sojem 305 kada je koncentracija somatskih ćelija bila $\geq 8,8 \times 10^5$ /mL. Unutar neutrofilnih granulocita, bakterije *Staph. aureus* se potom oslobađaju njihovim raspadom i apoptozom. Sa selekcijskog stanovišta, krave koje preslabo ili prejako reaguju na infekcije sa PMNL, slabije kontrolišu porast *Staph. aureus* prilikom infekcije (Detilleux, 2004).

Mattos i sar. (1999) su napravili korak dalje u alternativnoj terapiji endometritisa kobila kada su zajedno sa homolognom krvnom plazmom koristili i leukocite dobijene spontanom sedimentacijom na koncentracionom gradijentu u rastvoru dekstroze. Ukupno je analizirano 342 pripusta (262 u laktaciji i 80 nepripuštenih, neždrebni („prazni” kobila). Ranim ehosonografskim pregledom u grupi kobila koje nisu bile ždrebne ustanovljen je značajno veći uspeh u koncepciji nakon tretmana krvnom plazmom i leukocitima (78,6%), nego kod kobila tretiranih oksitocinom (50,0%; $p < 0,05$) i kod netretiranih kobila. Nije bilo značajnih razlika u odnosu na grupu kobila koje su istovre-

meno tretirane kombinacijom plazma-leukociti i oksitocinom (69,2%). U prilog uspehu terapije autor navodi i činjenicu da su grupu tretiranu plazmom i leukocitima sačinjavale znatno starije kobile, kod kojih se mogla očekivati otežana koncepcija usled češćih degenerativnih i inflamatornih oštećenja endometrijuma.

U tom pravcu, radi praktičnije primene, Zerbe i sar. (2003) su usavršili tehniku izolacije i krioprezervacije leukocita radi lokalnog tretmana endometritisa. Izdvajanjem leukocita hipotoničnom lizom eritrocita, prikupljeno je 96,7% ćelija (97,1% živih), dok se sedimentacijom u dekstrozi, može dobiti 58,7% PMNL (od čega 97,8% živih). Štaviše, u odnosu na sveže PMNL, otopljeni PMNL su imali nešto viši fagocitni kapacitet za opsonizovane streptokoke (75%:70%). Sposobnost stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika je takođe bila veća, a ova aktivnost je trajala i nakon 6 sati od momenta odmrzavanja. Rezultati ovih ispitivanja ukazuju da se se nakon krioprezervacije PMNL može očuvati njihova funkcionalna sposobnost neophodna za terapijsku primenu kod kobile koje su podložne endometritisima.

U jednoj novijoj studiji Milovanović (2014) navodi da je najbolji uspeh u tretmanu krava sa bezsimptomskim sterilitetom postignut u grupi tretiranoj IU infuzijom rastvora glikogena ostriga i homologne krvne plazme (12/20 steonih; steonost 63,16%). Posle tretmana aplikacijom PGF steonost je bila 47,62% (20/42;), a Lugolovim rastvorom 25,00% (6/24). U kontrolnoj grupi (bez terapije) je bilo samo 30% steonih krava (3/10). Najmanji utrošak doza i najkraće vreme

potrebno do upešnog osemenjavanja (do 2 cikusa) je registrovano u grupi krava tretiranoj glikogenom ostriga (1,50 doza i 39,75 dana).

ULOGA VITAMINA C U IMUNITETU DOMAĆIH ŽIVOTINJA

Fiziološke posledice subkliničkog nedostatka askorbinske kiseline su multifaktorijalne i danas se smatra da je optimalan nivo askorbinske kiseline u organizmu od velike važnosti za efektivnost imunskog sistema (Bendich, 1989, 1992). Vitamin C može indirektno poboljšati imuni odgovor organizma, omogućavajući održavanje nivoa vitamina E u tkivima i zbog toga je on potreban za rast i oporavak tkiva u svim delovima tela.

Uloga vitamina C u imunitetu domaćih životinja, može se sagledati kroz ocenu antioksidativne sposobnosti i nivoa askorbinske kiseline u neutrofilnim granulocitima krvi, koji predstavljaju prvi odgovor imunog sistema organizma na infekciju (Anderson i sar., 1990; Bendich, 1989, 1992; Beisel, 1982; Gerber, 1975; Naresh i sar., 2003; Padayatty i sar., 2003; Ramanathan i sar., 2002; Roth i Kaeberle, 1985; Wróbel i sar., 2003).

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

smanjenje štetnog dejstva slobodnih radikalna i poboljšanje funkcije neutrofilnih granulocita (Politis i sar., 1995).

Smatra se da askorbinska kiselina štiti DNK ćelija od oštećenja slobodnim radikalima, sprečava infekcije jačanjem ćelijske membrane i pomaže u zaštiti fagocitnih ćelija od oksidativnog oštećenja (Nagórna-Stasiak i sar., 1997; Naresh i sar., 2003). Utvrđeno je i da su pojedini antioksidansi, uključujući i vitamin C, u stanju da spreče oštećenje leukocita u različitom stepenu. Tako se smatra da je stepen zaštite askorbinskom kiselinom 41%, α -tokoferolom 55%, a β -karotenom - 50% (Ramanathan i sar., 2002).

Nedostatak askorbinske kiseline može uticati na smanjenje sposobnosti ćelija da migriraju na mesto inflamacije, omogućavajući povećano oksidativno oštećenje neutrofila i smanjenu sintezu glavnog antimikrobnog agensa–hipohlorične kiseline, što se odražava i kroz negativan uticaj na proliferaciju limfocita. Ukoliko je nivo askorbinske kiseline optimalan, proliferacija limfocita se pravilno odvija (Anderson i sar., 1990), uz stimulisanu proizvodnju interferona (Gerber, 1975).

Neutrofilni granulociti sadrže oko 40-60 puta više vitamina C nego krvna plazma i dokazano je da su njihova pokretljivost i fagocitni kapacitet poboljšani nakon suplementacije vitaminom C (Roth i Kaeberle, 1985). Nivo askorbinske kiseline je visok u zrelim perifernim neutrofilnim granulocitima krvi (Padayatty i sar., 2003), ali načini njenog delovanja na nji-

hov metabolizam i funkciju su još uvek nedovoljno poznati. Dokazano je da C vitamin utiče na hemotaksiju i stepen fagocitoze (Goldschmidt, 1991).

Mlinar (2016) navodi da je kod krava, tretiranih supkutano velikim dozama C vitamina, registrovano statistički značajno povećanje procenta aktiviranih polimorfonuklearnih leukocita i monocita krvi ($p < 0,001$) uključenih u proces fagocitoze kao i veći intenzitet fagocitoze. Ovo nesporno govori o snažnom stimulatивnom dejstvu vitamina C na odbrambeni sistem. Stimulativni efekti su zabeleženi i kod polimorfonuklearnih leukocita mleka ali je fagocitoza bila niskog intenziteta ($< 5\%$ aktivnih ćelija; $p < 0,05$). Isti autor je utvrdio da je procenat polimorfonuklearnih leukocita krvi koji su izvršili respiratorni prasak bio statistički značajno viši ($p < 0,05$) u grupi krava tretiranoj vitaminom C i zaključio da terapija subkliničkih mastitisa, visokim dozama vitamina C može biti prihvatljiva alternativa ili potpora antibiotskoj terapiji.

PRIMENA LEVAMIZOLA U MODELU EKSPERIMENTALNOG AUTOIMUNOG ENCEFALOMIJELITISA

Kao što je već izneto u uvodnom delu, široko primenjivani antihelmintik levamizol ispoljava i imunostimulatorne efekte. Međutim, u ogleđima koji su bili postavljeni sa ciljem da se utvrdi njegovo delovanje kod životinja sa indukovanim

autoimunim poremećajem, ubedljivo je dokazano da ovaj lek dovodi do imunosupresije (Ilić, 2001, Ilić i sar. 2001a, Ilić i sar. 2001b). Ova ispitivanja su vršena na ženkama pacova soja Dark Agouti (DA) kod kojih izazvan eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis (EAE). Kod obolelih jedinki je posle tretmana levamizolom dolazilo do odlaganja početka bolesti, ublažavanja kliničkih simptoma i ubrzanja oporavka. Step en izraženosti histopatoloških lezija u mozgu ženki sa izazvanim EAE je bio značajno manji ukoliko su tretirane levamizolom u dozi od 2,2 mg/kg svakog drugog dana od početka imunizacije. U venskoj krvi ovih jedinki došlo je do statistički značajnog porasta broja CD4-CD8+ limfocita u odnosu na netretiranu grupu.

PRIMENA EKSTRAKTA KUKUREKA (*H. ODORUS* W. ET K.) KAO IMUNOMODULATORA

Brojnim istraživanjima je potvrđeno da ekstrakt rizoma i korena kukureka ispoljava stimulatorne efekta na imunski sistem, a opisani su i imunosupresivni efekti. Još uvek međutim nisu dovoljno precizno upoznati mehanizmi kojima ekstrakt ove biljke ispoljava ovako kontradiktorne efekte. Ekstrakt rizoma i korena kukureka deluje na imunski sistem zavise od doze, načina aplikacije i vrste procesa na koji deluje, tako da može ispoljiti stimulatorne ili supresorske efekte. Ovo je inače i generalna karakteristika brojnih imunomodulatornih substanci.

Bogdan i sar. (1989, 1990a) su transkutano implantirali rizom kukureka *H.*

purpurascens W. et K. ovcama, svinjama, kravama i konjima. Analiza diferencijalne krvne slike je potvrdila izraženu leukocitozu i neutrofiliju kod svih tretiranih životinja koja je trajala više od 6 dana (izuzev kod ovaca). Indeks fagocitoze neutrofilnih granulocita je takođe bio povećan, a vrednost ukupnog kapaciteta fagocitoze neutrofilnih granulocita povećala se više od 6 puta, pri čemu je utvrđena razlika bila statistički vrlo značajna posle 48h ($P < 0,01$).

Iz ekstrakta rizoma i korena kukureka, Bogdan i sar. (1990b) su izolovali saponozide koje su aplikovali ovcama. Autori su utvrdili da je dinamika promena u broju neutrofilnih granulocita slična sa dinamikom promena u broju leukocita i da je najizraženija leukocitoza sa neutrofilijom postignuta nakon 24h. Utrošak glukoze od strane ćelija krvi je u proseku bio za 251% veći nakon aplikacije ekstrakta saponozida što je potvrdilo imunostimulativni efekat ovog preparata.

Prečišćeni ekstrakt *Helleborus* sp. ispoljava efekat potenciranja postvaccinalnog imunološkog odgovora, koji se može uporediti sa delovanjem drugih proizvoda korišćenih u istu svrhu (Bolte i sar. 2001). Ako se aplikuje teladima i junadima, istovremeno sa vakcinom protiv salmoneloze, on aktivira kako specifične (porast titra antitela), tako i nespecifične (povećanje broja leukocita, koncentracije properdina i lizozima) mehanizme imunološkog odgovora. Dobijeni rezultati su potvrdili da ekstrakt *Helleborus* sp. izaziva modifikaciju imunskog odgovora u stanjima primarne ili sekundarne imunodeficijenci-

je. Koncentracija gamaglobulina se povećala kod obe grupe, ali značajno više kod eksperimentalne. Kod obe grupe je konstatovan značajan porast broja leukocita posle 14 i 21 dana bez vidljive razlike među grupama, što se odnosi i na promene u broju neutrofilnih, eozinofilnih i bazofilnih granulocita. Koncentracija antitela kod tretirane grupe teladi je bila veća za 69,5% posle 7 dana, za 105,6% posle 14 dana i za 81,1% nakon 21 dana u odnosu na konstatovane vrednosti kod kontrolne grupe u istom vremenskom intervalu. Utvrđeno je i da prečišćeni ekstrakt *Helleborus* sp. stimuliše ćelijsku multiplikaciju, aktiviranje makrofaga i oslobađanje IL-2, TNF i interferona.

Ristoska (2002) opisuje uticaj ekstrakta rizoma i korena *H. odorus* W. et K. aplikovanog intramuskularno, u dozi 450 µg/kg t.m., nazimicama u periodu polne zrelosti, u starosti od 8 meseci, na parametre krvne slike nakon 24h i utvrdila da on izaziva izraženu leukocitozu i da pozitivno utiče na reproduktivna svojstva, plodnost i broj živorođene prasadi. Tosevski i sar. (2004) su ispitivali uticaj ekstrakta cele biljke *H. odorus* W. et K. Kod prasadi u starosti od 52 dana i dokazali izraženu leukocitozu i neutrofiliju, blagu monocitozu ali ne i promene u broju limfocita.

Analizirajući visoko prečišćeni ekstrakt *H. purpurascens* W. et K. (HP12) Kerrek (1997) je utvrdio da on deluje različito na aktivnost NK ćelija: kod reumatičnih pacijenata jasno se snižava patološki uvećana spontana citotoksičnost, dok se kod zdravih pacijenata spontana citotoksičnost neznatno povećava. Autor smatra

da izolovane aktivne supstance učesvuju u bioregulaciji Na⁺-K⁺ - ATP-aze i nekih drugih enzima, smanjenju oštećenja tkiva kod autoimunih bolesti, imunoregulaciji vezivanjem za Fc receptore i terapiji bola vezivanjem za nociceptore.

Ispitivanje uticaja ekstrakta rizoma i korena *H. odorus* W. et K. na imunski sistem pacova soja Wistar, starosti 45 dana, sproveli su Milanović i sar. (2004). Nakon 24h od tretmana određivan je ukupan broj leukocita i zastupljenost neutrofilnih granulocita. U ovom ogledu su dokazane statistički značajne razlike (p<0,05) u broju leukocita između kontrolne grupe i grupe kojoj je aplikovan ekstrakt kukureka. Razlika u broju i procentualnoj zastupljenosti neutrofilnih granulocita je bila statistički vrlo značajna (P<0,01).

Davidović i sar. (2010) i Davidović (2013), su u svojim ispitivanjima dokazali da intramuskularna aplikacija vodenog i metanolnog ekstrakta kukureka (*H. odorus* W. et K.) pacovima soja Wistar ima za posledicu dozno zavisnu leukocitozu i granulocitozu čak i posle tretmana deksametazonom. Ovi ekstrakti su dovodili i do limfopenije, ubrzavanja sedimentacije i smanjenja koncentracije serumskih albumina. Koncentracija haptoglobina je takođe bila povećana ali ne i kod jedinki kojima je prethodno aplikovan deksametazon. Dokazano je da vodeni i metanolni ekstrakt kukureka značajno povećavaju stepen fagocitoze i intenzitet oksidativnog praska neutrofilnih granulocita.

ZAKLJUČAK/CONCLUSION

Iz iznetih podataka može da se zaključi da imunostimulatori sve više dobijaju na značaju u humanoј i u veterinarskoј medicini, ali da njihova primena nije nimalo jednostavna. Poteškoće proizilaze iz činjenica da su neke od ovih supstanci toksične u većim dozama, da neke mogu da ispolje i supresivne efekte i da njihovi efekti u velikoj meri zavise od trenutnog funkcionalnog stanja imunskog sistema pacijenta (što takođe nije lako utvrditi). Zbog toga je pri upotrebi ovakvih supstanci neophodan veliki oprez mada ima i takvih preparata za koje se slobodno može reći da su dovoljno bezbedni. U svakom slučaju, kao i za svaki drugi lek, neophodni su konzistentni laboratorijski i jasni klinički dokazi da bi njihova primena postala deo rutinske medicinske prakse.

Napomena:

Rad je podrжан sredstvima projekta III 46002 iz programa integrisanih i interdisciplinarnih istraživanja finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA/REFERENCES

1. Anderson R., Smit M.J., Joone G.K., Van Staden A.M. (1990): *Vitamin C and cellular immune functions: protection against hypochlorous acid-mediated inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and ATP generation in human leukocytes as a possible mechanism of ascorbate mediated immunostimulation*, Annuals of the New York Academy of Sciences, 587:34–48.
2. Anderson K.L., Hamida N.A., Frank A., Whitmore H.L., Gustafsson B.K. (1985): *Collection and phagocytic evaluation of uterine neutrophilic leukocyte*, Theriogenology 24, 205–15.
3. Asbury A.C. (1984): *Uterine defense mechanism in mare; The use of intrauterine plasma in the management of endometritis*, Theriogenology, 21: 378–93.
4. Asbury A.C., Lyle S.K. (1993): *Infectious causes of infertility*, Ch 43, McKinnon AO i Voss JL, Equine Reproduction, Blackwell Publisher,
5. Baĝnu O., Esra B., Keskin M., Celikbicak O., Salih B. Alp A. (2012): *Therapeutic effects of Mycobacterium phlei cell wall extracts*, Turkish Journal of Medical Science, 42, 2, 193–9.
6. Beisel W.R. (1982): *Single nutrients and immunity*, American Journal of Clinical Nutrition, 35 (2 Suppl):417–68.
7. Bendich A. (1989): *Antioxidant Vitamins and Their Functions in Immune Responses*, In: Bendich A, Phillips M, Tengerdy RB, editors, Antioxidant nutrients and their immune functions, New York: Plenum Publishing Co. 408–21.
8. Bendich A. (1992): *Ascorbic Acid and Immune Functions*, In: Wenk C, Fenster R, Volkerl L, editors, Ascorbic acid in domestic animals, Zurich: Institut fur Nutzliervissenschaften.
9. Bogdan I., Bașea I., Nechifor A.,

- Hruban E., (1989)L: *Cercetări privind efectul implantului de spin (Helleborus purpurascens L.) la bovine, cabaline, ovine și porcine*, Bulletin IACN, ZMV, 43, 67–72.
10. Bogdan I., Nechifor A., Bășea I., Hruban E. (1990a), *Aus der rumänischen Volksmedizin: Unspezifische Reiztherapie durch transkutane implantation der Nieswurz (Helleborus purpurascens, Fam. Ranunculaceae) bei landwirtschaftlichen Nutztieren*, Deutsche tierärztliche Wochenschrift, 97, 12, 525–9.
11. Bogdan I., Nechifor A., Ghițulescu C. (1990b): *Experimentarea a trei variante de extract injectabil de spînz (Helleborus purpurascens, fam. Ranunculaceae) la ovine*, Simpozionul Actualitati in patologia animalelor, Cluj-Napoca, XVII, 31–44.
12. Bolte S., Petruț H., Trif R. (2001): *Imunostimularea cu extract de Helleborus spp.*, Lucrări științifice med. vet., XXXIV, Timișoara, 79–86.
13. Bray M., O’Leary S., Brooke G., Maddocks S., Armstrong D.T. (2004), *Novel Immune Modulation to Improve Reproductive Outcomes in Pigs*, Research Centre for Reproductive Health, The University of Adelaide, Woodville, SA, Australia; 2SARDI, Livestock Systems, Roseworthy, SA, Australia.
14. Christofersen M., Woodward E.M., Bojesen A.M., Petersen M.R., Squires E.L., Lehn-Jensen H., Troedsson M.H.T. (2012): *Effect of immunomodulatory therapy on the endometrial inflammatory response to induced infectious endometritis in susceptible mares*, Theriogenology, 78, 5, 991–1004.
15. Davidović V. (2013): *Uticaј sastojaka kukureka (Helleborus odoratus Waldst et Kit) na hematološke parametre, proteine akutne faze i funkcije neutrofilnih granulocitacova*, Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, 1–322.
16. Davidović V., Lazarević M., Joksimović-Todorović M., Maksimović Z., Jovanović M. (2010): *The effect of extract of rhizome and root of Hellebore (Helleborus odorus W et K) on parameters of white blood count and degree of phagocytosis in Wistar rats*, Acta Veterinaria, Belgrade, 60, 5–6, 605–18.
17. Day M.J., Shultz R.D, (2014), *Immunotherapy*, In Veterinary Immunology - Principles and Practice, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, London New York.
18. Dettloux J.C. (2004): *Neutrophils in the War Against Staphylococcus aureus: Predator-Prey Models to the Rescue*, Journal of Dairy Science, 87:3716–24.
19. Dhama K., Chakraborty S., Tiwari R. (2013): *Panchgavya therapy (Cowpathy) in safeguarding health of animals and humans*, A review, Research and Opinions in Animal and Veterinary Sciences, 3:170–8.
20. Dhama K., Saminathan M., Jacob S.S., Singh M., Karthik K., Amar-

- pal M., Tiwari R, Sunkara L.T, Malik YS, Singh R.K. (2015), *Effect of immunomodulation and Immunomodulatory Agents on Health with Some Bioactive Principles, Modes of Action and Potent Biomedical Applications*, International Journal of Pharmacology, 11, 4, 253–90.
21. Filion M.C., Lepicier P, Morales A., Philips N.C. (1999): *Mycobacterium phlei cell wall complex directly induces apoptosis in human bladder cancer cells*, British Journal of Cancer, 79, 2, 229–35.
 22. Fumuso E., Giguère S., Wade J., Rogan D. Videla-Dorna I., Bowden R.A. (2003): *Endometrial IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha, mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis. Effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation*, Veterinary Immunology and Immunopathology, 96,1-2, 31–41.
 23. Fumuso EA, Aguilar J, Giguère S, Rivulgo M, Wade J, Rogan D. (2007), *Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: effects of immunomodulation*, Veterinary Immunology Immunopathology, 118, 1–2, 30–9. E pub 2007 May 3.
 24. Gerber W.F. (1975): *Effect of ascorbic acid, sodium salicylate and caffeine on the serum interferon level in response to viral infection*, Pharmacology, 13, 3:228-33.
 25. Goldschmidt M.C. (1991): *Reduced bactericidal activity in neutrophils from scorbutic animals and the effect of ascorbic acid on these target bacteria in vivo and in vitro*, American Journal of Clinical Nutrition, 54 (6 Suppl):1214S-1220S.
 26. Håkansson A., Albihn A., Magnusson U. (1993): *The contribution of complement to opsonic activity in the uterine secretions of mares free of endometritis*, Theriogenology, 39, 3, 601–9.
 27. Hancock R.E.W., Sahl H.G. (2006), *Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic*, National Biotechnology, 24: 1551–7.
 28. Hengartner B., Henggeler M., Kohler S., Spring P. (2005): *Effects of dietary mannan-oligosaccharide on plasma Ig G concentrations in piglets*, Proceedings of Antimicrobial Growth Promoters: Worldwide Ban on the Horizon, Noordwijk aan Zee, The Netherlands, 101.
 29. Hussain A.M., Daniel R.C.W. (1991): *Bovine endometritis: current and future alternative therapy*. Zentralblatt zur Veterinärmedizin A. Nov, 38 (9):641–51. Review.
 30. Ilić V. (2001): *Ispitivanje imunomodulatornih uloga levamizola na modelu eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa pacova soja Dark Agouti*, Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, 1–117.
 31. Ilić V., Lazarević M., Rauški A., Popović N., Kosec D. (2001a), *Levamisole modulates experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in DA rats*, Acta Veterinaria, Belgrade, 51, 2-3, 89–101.

32. Ilić V., Lazarević M., Rauški A., Popović N. (2001b): *The influence of levamisole on clinical signs and histopathological changes in the brains of DA rats with experimentally induced autoimmune encephalomyelitis*, Folia Veterinaria, 45, 4, Suppl., 20–3.
33. Jovanović M., Lazarević M., Popović N., Đurđević D. (2006): *The influence of thymic extract on hematological parameter values in irradiated Wistar rats*, Acta Veterinaria, Belgrade, 56, 2–3, 137–48.
34. Jovanović M. (2007): *Ispitivanje uticaja ekstrakta govedeg timusa na imunski odgovor pacova izloženih različitim dozama jonizujućeg zračenja*, Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, 1–224.
35. Kerek F. (1997): Offenlegungsschrift, Patentnummer: DE 196 00 301 A1, Bioregulatorischer Wirkstoff, Verfahren zu seiner Herstellung sowie dessen Verwendung, Deutsches Patentamt, München, Germany.
36. Lazarević M. (2003): *Mannan-oligosaccharides enhance absorption of colostral Ig G in newborn calves and piglets*, Poster presented at Alltech's Annual Nutritional Biotechnology in the Feed & Food Industries Symposium, Lexington.
37. Lazarević M. (2005): *Mannan-oligosaccharides enhances absorption of colostral Ig in newborn calves and piglets*. In Proceedings of the 56th Meeting of the European Association for Animal Production, Uppsala, Sweden (ed. Y. van der Honing), Wageningen Academic Press, Wageningen, The Netherlands, 153.
38. Lazarević M., Milovanović A., Barina T., Miljas N., Milanov D. (2012): *Endometritis therapy in sows by intrauterine instillation of yeast cell wall solution*, Acta Veterinaria, Belgrade, 61, 5–6, 611–27.
39. Lazarević M., Spring P., Šabanović M., Tokić V., Tucker A.L. (2010): *Effect of gut active carbohydrates on plasma IgG concentrations in piglets and calves*, Animal, 4, 6, 438–43.
40. Mattos R.C., Meirelles L.S., Malschitzky E., Castilho L.F.F., Neves A.P., Mattos A.L.G., Viera M.J., Keller A., Hott A.K., Gregory R.M. (1999): *Oxytocin, plasma containing leucocytes or combination of both as treatment of postbreeding endometritis in the horse*. Pferdeheilkunde, 15, 584–7.
41. Milanović S., Lazarević M., Jovanović M. (2004): *Uticaj ekstrakta korena Helleborus odoratus na imunski sistem pacova soja Wistar*, Zbornik radova, 6. međunarodno savetovanje iz kliničke patologije i terapije životinja "Clinica veterinaria", Budva, 355–7.
42. Miljas N. (2013): *Primena mannan-oligosaharida u terapiji puerperalne infekcije uterusu krmača*, Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija, 1–107.

43. Milovanović A. (2014): *Ispitivanje uticaja funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita i progesteronskog profila na razvoj poremećaja u reprodukciji krava*, Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, 1–235.
44. Mlinar S., 2016, *Uticaj visoke doze C vitamina na funkcije neutrofilnih granulocita visoko-mlečnih krava sa subkliničkim masitisima*, Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, 1–276.
45. Nagórna-Stasiak B., Lechowski J., Kowalczyk M. (1997): *The effect of vitamin E on ascorbic acid synthesis in chicken*, Medycyna Weterynaryjna, 53, 4, 224–6.
46. Naresh R., Dwivedi S.K., Swarup D., Patra R.C. (2003): *Effect of ascorbic acid on milk lead and cadmium level on subclinical and clinical cases of mastitis*, Bulletin of Environmental and Contamination Toxicology, 71, 5:899–904.
47. Paape M.J., Schultze W.D., Guidry A.J., Kortum W.M., Weinland B.T. (1981): *Effect of an intra-mammary polyethylene device on the concentration of leukocytes and immunoglobulins in milk and on the leukocyte response to Escherichia coli endotoxin and challenge exposure with Staphylococcus aureus*, American Journal of Veterinary Research, 42, 774–83.
48. Padayatty S.J., Katz A., Wang Y., Eck P., Kwon O., Lee J.H. et al. (2003): *Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention*, Journal of American College Nutrition, 22, 1:18–35.
49. Pascoe D.R., (1995): *Effect of adding autologous plasma to an intrauterine antibiotic therapy after breeding on pregnancy rates in mares*, Biol Reprod Mono, 1, 539–43.
50. Politis I., Hidiroglou M., Batra R.T., Gilmore J.A., Gorewit R.C., Sherf H. (1995): *Effects of vitamin E on immune function of dairy cows*, American Journal of Veterinary Research, 56, 2:179–84.
51. Ramanathan K., Balakumar S., Panneerselvam C. 2002: *Effects of ascorbic acid and alpha-tocopherol on arsenic-induced oxidative stress*, Human and Experimental Toxicology, 21, 12:675–80.
52. Ristoska D. (2002): *Vlijanieto na ekstraktot od Helleborus odorus vrz krvnata slika i proteinemijata kaj svinjite*, Magistarska teza, Skoplje.
53. Risvanli A. (2011), *Reproductive Immunology in Mares*, Asian Journal of Animal Vetererinary Advances, 6, 6, 545–54.
54. Rogan D., Fumuso E., Rodriguez E., Wade J., Sanchez-Bruni S.F. (2007): *Use of a Mycobacterial Cell Wall Extract (MCWE) in Susceptible Mares to Clear Experimentally Induced Endometritis With Streptococcus zooepidemicus*, Journal of Equine Veterinary Sciences, 27, 3, 112–7.
55. Roth J.A., Kaeberle M.L. (1985): *In vivo effect of ascorbic acid on neutrophil function in healthy and dexamethasone treated cattle*,

- American Journal of Veterinary Research, 46, 12, 2434–6.
56. Šabanović M. (2005): *Ispitivanje uticaja manan-oligosaharida na resorpciju kolostralnih imunoglobulina kod teladi*, Doktorska disertacija, Veterinarski fakultet Sarajevo, Federacija BiH, 1-110.
57. Sims M.D., Dawson K.A., Newman K.E., Spring P., Hooge D.M. (2004): *Effects of dietary mannan-oligosaccharide, bacitracin methylene di-salicylate or both on the live performance and intestinal microbiology of turkeys*, Poultry Science, 83: 1148–54.
58. Singh J., Nanda A.S., Dhaliwal G.S. (2003): *Treatment of bacterial endometritis in crossbred cows using intrauterine oyster-glycogen, a non-specific immunomodulator*, Indian Journal Animal Science, 73, 8, 844–7.
59. Spring P., Wenk C., Dawson K.A., Newman K.E. (2000): *The effect of dietary mannan-oligosaccharides on caecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the caeca of Salmonella-challenged broiler chicks*, Poultry Science, 79: 205–11,
60. Tizard I.R. (1996): *Hypersensitivity*, 343–401, in Veterinary Immunology, An Introduction, WB Saunders Co., Philadelphia, PA.
61. Tokić V. (2011): *Uticaj manan-oligosaharida na biohemijski profil i prirast prasadi do momenta zaluzenja*, Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija, 1–89.
62. Tosevski J., Ulčar I., Hajrulai-Musliu Z., Ristoska D., Lončarević A. (2004): *Primena mitogenih sastojaka biljnog porekla u veterinarskoj praksi*, Zbornik radova, 6. međunarodno savetovanje iz kliničke patologije i terapije životinja “*Clinica veterinaria*” Budva, 100–6.
63. Vasiljević T. (2015): *Uticaj ekstrakta Mycobacterium phlei dodatog u seme nerasta, na kvalitet ejakulata, koncepciju krmača i veličinu legala*, Specijalistički rad, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija, 1–112.
64. Vézina S.A., Archambault D. (1997): *Modulatory effect of mycobacterium cell wall extract (Regressin) on lymphocyte blastogenic activity and macrophage cytokine gene transcription in swine*, Clinical Diagnostics and Laboratory Immunology, 4, 3, 314–20.
65. Watson E.D., Stokes C.R. (1987): *Cellular and humoral mechanism in mares susceptible and resistant to persistent endometritis*, Veterinary Immunology Immunopathology, 16: 107–21.
66. Williamson P., Manyua R., Martin R., Penhale W.J. (1987): *Dynamics of the acute uterine response to infection, endotoxin infusion and physical manipulation of the reproductive tract in the mare*, Journal of Reproduction and Fertility, Suppl, 35, 317–25.
67. Wróbel A., Łukaszyńska B., Kędzierska J. (2003): *The effect of pe-*

roxynitryte and some antioxidants on the rate of osmotic hemolysis of bovine erythrocytes, *Cellular and Molecular Biology Letters*, 8, 2 :455–60.

68. Zemjanis R. (1980): "Repeat breeding" or conception failure in cattle. D.A. Morrow (Editor), *Current Therapy in Theriogenology*, W.B. Saunders, Philadelphia, 205–13.
69. Zerbe H., Castilho L.F., Engelke F., Mattos R.C., Schuberth H.J., Klug E., Leibold W. (2003): *Isolation and cryopreservation of functionally*

competent equine leucocytes, *Journal of Veterinary Medical Association Physiology, Pathology and Clinical Medicine*, 50, 4, 179–84.

70. Zhao X., Li R., Huang J., Li J., Hou M., Zhong J. (2012) *Association of some physiological factors and milk performance in Chinese Holstein*, *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7:1356–63.

Rad primljen: 18.5.2017.

Rad odobren: 03.8.2017.

