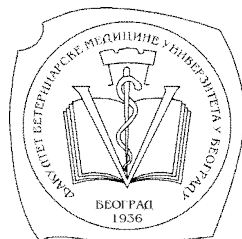


UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE



Svetlana Nedić

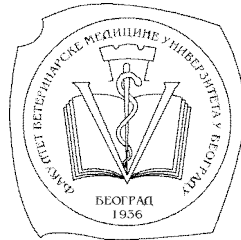
Doktor veterinarske medicine

**Ispitivanje povezanosti oksidativnog stresa i
lipidnog statusa kod krava sa supkličkim
mastitisom izazvanim sa bakterijom
*Staphylococcus aureus***

Doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE



Svetlana Nedić

Doctor of veterinary medicine

**Relationship between oxidative stress parameters
and lipid status of cows with subclinical mastitis
caused by bacteria *Staphylococcus aureus***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

MENTORI

dr Slobodanka Vakanjac, redovni profesor, mentor 1
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

dr Slavoljub Jović, vanredni profesor, mentor 2
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE

dr Sunčica Borozan, redovni profesor
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

dr Vera Katić, redovni profesor u penziji
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

dr Marko Samardžija redovni profesor u trajnom zvanju
Veterinarski fakultet Univerziteta u Zagrebu

Datum odbrane

.....

Ispitivanje povezanosti oksidativnog stresa i lipidnog statusa kod krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim sa bakterijom *Staphylococcus aureus*

Kratak sadržaj

Iako su mastitisi veoma aktuelna tema istraživanja, oni su i dalje jedno od najvažnijih oboljenja mlečnih krava koje prouzrokuje velike ekonomske gubitke u govedarskoj proizvodnji širom sveta. Tokom mastitisa smanjena je produkcija mleka, visoki su troškovi lečenja, mleko se odbacuje zbog upotrebe antimikrobnih preparata, a krave se često prevremeno isključuju iz proizvodnje. Zbog svojih fenotipskih i genotipskih osobina, *Staphylococcus aureus* ima veliki značaj u etiologiji oboljenja mlečne žlezde. Infekcije mlečne žlezde bakterijom *S. aureus* uglavnom su po toku supkliničke, sa povećanim brojem somatskih ćelija (*eng.* somatic cell count - SCC), bez vidljivih promena u mleku i na vimenu, teško se otkrivaju i imaju veoma nisku stopu izlečenja. Jednom inficirana životinja može izlučivati uzročnika infekcije tokom više laktacija, a i nakon oporavka četvrti inficiranih bakterijom *S. aureus* postoji velika mogućnost reinfekcije.

Nakon što patogeni mikroorganizmi prodru u mlečnu žlezdu, bakterijski toksini, enzimi i komponente ćelijskog zida direktno utiču na funkciju epitelih ćelija mlečne žlezde, ali takođe stimulišu brojne medijatore inflamacije. Zahvaljujući promenama u vaskularnom endotelu, polimorfonuklearni leukociti, kao što su neutrofilni i makrofage, migriraju ka žarištu infekcije i infiltriraju mesto trauma, čime se značajno povećava SCC u mleku. Smatra se da neutrofilni granulociti doprinose eliminaciji bakterija, pre svega fagocitozom i intracelularnim ubijanjem, kao i oslobađanjem reaktivnih kiseoničnih vrsta (*eng.* reactive oxygen species - ROS) i antimikrobnih polipeptida. Nastale ROS oštećuju bakterije, ali ukoliko njihov nastanak prevaziđe mogućnost antioksidativne zaštite organizma da ih neutrališe nastaje oksidativni stres i, u zavisnosti od dužine i težine zapaljenskog procesa, manja ili veća oštećenja ćelija i tkiva domaćina.

Detaljnije razumevanje veze između oksido-redukcionog statusa organizma i pojave mastitisa krava moglo bi dovesti do razvoja efikasnijih strategija u prevenciji ovog oboljenja. Ispitivanje parametara oksidativnog statusa krava sa mastitisom može doprineti boljem

poznavanju patofiziologije mastitisa i ranom otkrivanju bolesti kako bi se blagovremeno započela terapija, smanjilo oštećenje vimena i pad proizvodnje mleka, a samim tim i ekonomski gubitci.

Cilj ovog istraživanja je bio da se ispita oksido-redukциони status krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim bakterijom *S. aureus* preko parametara antioksidativne zaštite i oksidativnog stresa, kao i da se utvrdi povezanost datih parametara sa lipidnim statusom jedinke. Praćeni su sledeći parametri oksidativnog stresa u krvi i mlečnom serumu: koncentracija vodonik-peroksida (H_2O_2), aktivnosti enzima superoksid-dismutaze (SOD), katalaze (CAT), arilesteraza (PON1-ARE), paraoksonaze 1 (PON1), mijeloperoksidaza (MPO) i laktoperoksidaza (LPO), zatim analiza ukupnog antioksidativnog kapaciteta (primenom ABTS i DPPH testa), koncentracija malondialdehida (MDA), lipidnih-hidroperoksida (LOOH), nitrita (NO_2^-), uznapredovalih produkata oksidacije proteina (*eng.* advanced oxidation protein products - AOPP) i tiolnih grupa (-SH), kao i određivanje aktivnosti enzima laktat-dehidrogenaze (LDH). Od parametara lipidnog statusa u krvnom serumu praćeni su koncentracije holesterola velike gustine (HDL), male gustine (LDL), ukupnog holesterola (TC) i triglicerida (TG).

U ogled su bile uključene 104 mlečne krave. Kod 92 krave (135 uzoraka mleka) izolovan je *S. aureus*. Na osnovu broja kolonija (*eng.* colony forming unit - CFU) *S. aureus* po mililitru mleka krave sa supkliničkim mastitisom (SCM) podeljene su dalje na dve grupe: SCM_1 (< 1000 CFU/mL, $n = 37$ krava, 68 uzoraka mleka iz pojedinih četvrti vimena) i SCM_2 (≥ 1000 CFU/mL, $n = 55$, 67 uzoraka mleka iz pojedinih četvrti vimena). Obe grupe su imale slične vrednosti SCC određivane mikroskopski. Kontrolnu grupu krava (CON) činile su zdrave krave, kod kojih je Kalifornija mastitis test (KMT) i mikrobiološki nalaz na prisustvo bakterija bio negativan ($n = 12$, 48 četvrti mlečne žlezde).

Rezultati dobijeni u ovom ispitivanju pokazuju da supklinički mastitisi izazvani bakterijom *S. aureus* dovode do promena u lipidnom statusu: kod njih su utvrđene niže koncentracije HDL i više koncentracije LDL u krvnom serumu. Povećana osmotska fragilnost eritrocita i više koncentracije MDA utvrđene su u grupi krava sa većim brojem *S. aureus* u mleku. Tokom SCM izazvanog bakterijom *S. aureus* povećana je bila aktivnost enzima CAT, MPO i LPO, dok je inhibirana aktivnost SOD i PON1-ARE u krvi i mleku. Utvrđeno je da je kod SCM stepen lipidne peroksidacije (LP) povišen, kao i koncentracije MDA i LOOH. Kod SCM povećana je produkcija reaktivnih vrsta azota (*eng.* reactive nitrogen species - RNS), što je potvrđeno višim koncentracijama NO_2^- i AOPP, i nižim koncentracijama SH-grupa u krvi i

mleku. Da se kod krava sa SCM povećava potrošnja ukupnog antioksidativnog sistema, dokazano je nižim koncentracijama ukupnog antioksidativnog kapaciteta (TAC), određenog preko ABTS i DPPH testa.

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da je kod supkliničkih mastitisa krava izazvanih bakterijom *S. aureus* povišen nivo inflamacije, oksidativnih oštećenja lipida i proteina, kao i snižen ukupan antioksidativni kapacitet u krvi i mleku krava.

KLJUČNE REČI: mastitis, *Staphylococcus aureus*, oksidativni stres, krave

NAUČNA OBLAST: Veterinarska medicina

UŽA NAUČNA OBLAST: Porodiljstvo, fiziologija

UDK BROJ: 619:618.19-002

Relationship between oxidative stress parameters and lipid status of cows with subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*

Summary

Despite being frequently targeted in research, mastitis in cows has globally been contributing to high economic losses in dairy production. During mastitis, milk production is reduced, there are huge costs of therapy, milk discharge due to antibiotic use and premature culling of cows. Due to its phenotypic and genotypic characteristics, *Staphylococcus aureus* is of great importance in the etiology of mammary gland diseases. *S. aureus* infections of the mammary gland are mostly subclinical, with an increased somatic cell count (SCC), without visible changes in the milk and udder. They are difficult to detect and have a very low cure rate. Infected animals can excrete the pathogen during multiple lactations, and even after the recovery, there is a high possibility of reinfection with *S. aureus*. On the penetration of pathogenic microorganisms into the mammary gland, bacterial toxins, enzymes and cell wall components have a direct impact on the function of mammary gland epithelial cells, but they also stimulate numerous mediators of inflammation. Owing to the changes in the vascular endothelium polymorphonuclear leukocytes such as neutrophils and macrophages migrate to the site of infection and infiltrate the site of trauma, significantly increasing SCC in milk. Neutrophils are thought to contribute to the elimination of bacteria, primarily by phagocytosis and intracellular killing, as well as the release of reactive oxygen species (ROS) and antimicrobial polypeptides. The resulting ROS are harmful to bacteria, but if their occurrence exceeds the possibility of neutralization by the body's antioxidant protection, oxidative stress occurs and depending on the length and severity of the inflammatory process, damage to host cells and tissues.

A more detailed understanding of the connection between the oxidation-reduction status of the organism and the occurrence of mastitis could lead to the development of more effective strategies in the prevention of this disease. Evaluation of the oxidative status parameters of cows with mastitis can contribute to a better knowledge of the pathophysiology of mastitis and early detection of the disease, enable the beginning of therapy in time, reduce udder damage and decline in milk production, and thus economic losses.

The study was aimed to determine serum lipid values and parameters of oxidative stress in blood and milk of cows with subclinical mastitis (SCM) caused by *S. aureus* and to establish the association between these parameters. The following parameters of oxidative stress were examined: the concentrations of hydrogen peroxide (H₂O₂), the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), arylesterase (PON1-ARE), paraoxonase (PON1), myeloperoxidase (MPO), lactoperoxidase (LPO), the concentrations of total antioxidative capacity (through ABTS and DPPH test), the concentration of malondialdehyde (MDA), concentration of lipid hydroperoxide (LOOH), concentration of nitrite (NO₂⁻), concentration of advanced oxidation protein products (AOPP), the concentration of thiol groups (-SH), and activity of enzyme lactate-dehydrogenase (LDH). The following parameters of lipid status were also monitored: the concentrations of high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), total cholesterol and concentration of triglycerides.

Out of the 104 cows examined, in 92 (135 milk samples) *S. aureus* was isolated. Based on CFU of *S. aureus* per mL of milk the cows were divided into two groups: SCM₁ (< 1,000 CFU/mL, n = 37, 68 udder quarters) and SCM₂ (≥ 1,000 CFU/mL, n = 55, 67 quarters). Both groups had approximately the same SCC as determined by microscopy. The control group were cows with negative California mastitis test (CMT), and from whose milk no microorganisms were isolated (n = 12, 48 udder quarters).

The obtained results showed that subclinical mastitis caused by *S. aureus* led to changes in the lipid status, with lower concentrations of HDL and higher concentrations of LDL in the blood serum. The level of oxidative stress in the body is different depending on the intensity of bacterial infection: increased osmotic fragility of erythrocytes and higher MDA concentrations were found in the group of cows with higher numbers of *S. aureus* in milk. During subclinical mastitis, the activities of CAT, MPO and LPO increased, while the activities of SOD, PON1 and PON1-ARE in blood and milk were inhibited. The level of lipid peroxidation was found to be higher in subclinical mastitis, and higher concentrations of MDA and LOOH were found. In subclinical mastitis the production of reactive nitrogen species (RNS) increased, which was confirmed by higher concentrations NO₂⁻ and AOPP and lower concentrations of SH-groups in the blood and milk of cows with subclinical mastitis. In cows with subclinical mastitis concentrations of total antioxidant capacity were lower, which was determined in ABTS and DPPH test.

The results presented suggest that during subclinical mastitis the level of inflammation and the oxidative damage to lipids and proteins are increased, but the total antioxidant capacity in the blood and milk is reduced.

KEYWORDS: mastitis, *Staphylococcus aureus*, oxidative stress, cows

FIELD OF SCIENCE: Veterinary medicine

SPECIFIC FIELD OF SCIENCE: Veterinary obstetrics, physiology

UDK NUMBER: 619:618.19-002

SKRAĆENICE:

ABST - 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)

AOPP - (*eng.* advanced oxidation protein products) - uznapredovali produkti oksidacije proteina

ApoA - apolipoprotein-A

BSC - (*eng.* body score condition) - ocena telesne kondicije

CAT – katalaza

CFU - (*eng.* colony forming unit) broja kolonija

DPPH - 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil radikal

H₂O₂ – vodonik-peroksid

HDL - (*eng.* high density lipoproteins) - lipoproteini velike gustine

IDL - (*eng.* intermediate density lipoproteins) - lipoproteini srednje gustine

KMT – Kalifornija mastitis test

LDH – laktat-dehidrogenaza

LDL - (*eng.* low density lipoproteins) - lipoproteini male gustine

LOOH – lipidni-hidroperoksidi

LP - lipidna peroksidacija

LPO - laktoperoksidaze

MDA – malondialdehid

MPO - mijeloperoksidaze

NADPH – nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat

NEFA - neesterifikovane masne kiseline

NO - azot-monoksid

NO₂⁻ - nitriti

O₂^{•-} - super-oksid anjon radikal

•OH - hidroksilni radikal

¹O₂ - singletni kiseonik

ONOO⁻ - peroksinitrit

PAGE - poliakrilamid gel elektroforeza

PON1 – paraoksonaza 1

PON1 – ARE - arilesteraze

RCS – (*eng.* reactive carbonyl species) - reaktivne ugljenične vrste

RNS (*eng.* reactive nitrogen species) – reaktivne azotne vrste

ROS (*eng.* reactive oxygen species) - reaktivne kiseonične vrste

SAA – serum amiloid-A

SCC (*eng.* somatic cell count) - broj somatskih ćelija

SCM (*eng.* subclinical mastitis) – supklinički mastitis

-SH – sulfhidrilne (tiolne) grupe

SOD – superoksid-dismutaza

SPIN (*eng.* staphylococcal peroxidase inhibitor) - stafilokokni inhibitor peroksidaza

ROO• - peroksilni radikal

TAC (*eng.* total antioxidative capacity) – ukupan antioksidativni kapacitet

TBA (*eng.* thiobarbituric acid) - tiobarbiturna kiselina

TOC (*eng.* total oxidative capacity) – ukupan oksidativni kapacitet

TC (*eng.* total cholesterol) – ukupni holesterol

TG - trigliceridi

VLDL (*eng.* very low density lipoproteins) - lipoproteini jako male gustine

SADRŽAJ:

UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. MASTITIS KRAVA.....	4
2.1.1. Mastitis krava izazvan sa <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.1.2. Mehanizmi odbrane mlečne žlezde	9
2.1.2.1. Somatske ćelije i njihova uloga u odbrani mlečne žlezde	11
2.3. LIPIDNI STATUS KRAVA	15
2.4. OKSIDATIVNI STRES.....	16
2.4.1. Slobodni radikali	17
2.4.2. Mehanizmi odbrane od oksidativnog stresa	20
2.4.2.1. Enzimski mehanizmi antioksidativne zaštite	21
2.4.2.1.1. Superoksid-dismutaza (SOD)	21
2.4.2.1.2. Katalaza (CAT).....	22
2.4.2.1.3. Paraoksonaza 1 (PON1)	22
2.4.2.1.4. Mijeloperoksidaze (MPO).....	24
2.4.2.1.5. Lakteroperoksidaze (LPO)	25
2.5. OŠTEĆENJA BIOMAKROMOLEKULA USLED OKSIDATIVNOG STRESA.....	26
2.5.1. Lipidna peroksidacija.....	26
2.5.2. Oksidativne modifikacije proteina.....	27
2.6. OKSIDATIVNI STRES U RAZVOJU BOLESTI KOD MLEČNIH KRAVA	30
3.0. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA	34
4. MATERIJAL I METODE	35
4.1. DIZAJN EKSPERIMENTA	35
4.2. UZORKOVANJE BIOLOŠKOG MATERIJALA.....	36
4.3. METODE ISPITIVANJA	36
4.3.1. Određivanje broja somatskih ćelija u mleku.....	36

4.3.2. Mikrobiološka ispitivanja mleka.....	37
4.3.3. Određivanje lipidnog statusa	37
4.3.4. Određivanje parametara oksidativnog stresa u uzorcima krvi i mleka	38
4.3.4.1. Određivanje koncentracije vodonik-peroksida (H ₂ O ₂).....	38
4.3.4.2. Određivanje aktivnosti superoksid- dismutaze (SOD)	38
4.3.4.3. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)	38
4.3.4.4. Određivanje PON1-arilesterazne aktivnosti (PON1-ARE).....	39
4.3.4.5. Određivanje PON1-paraoksonazne aktivnosti (PON1)	39
4.3.4.6. Određivanje aktivnosti mijeloperoksidaza (MPO).....	39
4.3.4.7. Određivanje aktivnosti laktoperoksidaza (LPO)	40
4.3.4.8. Određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta	40
4.3.4.8.1. Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala	40
4.3.4.8.2. Određivanje sposobnosti neutralizacije ABTS radikala	41
4.3.5. Određivanje parametara oksidativnog oštećenja ćelije	41
4.3.5.1. Određivanje koncentracije malondialdehida (MDA)	41
4.3.5.1.1. Određivanje koncentracije hemoglobina.....	42
4.3.5.2. Određivanje koncentracije lipidnih-hidroperoksida (LOOH).....	42
4.3.5.3. Određivanje koncentracije nitrita (NO ₂ ⁻)	43
4.3.5.4. Određivanje koncentracije uznapredovalih proizvoda oksidacije proteina (AOPP) .	43
4.3.5.5. Određivanje koncentracije tiolnih grupa (SH)	43
4.3.5.6. Određivanje ukupne aktivnosti enzima laktat-dehidrogenaze (LDH)	44
4.3.5.7. Određivanje relativne aktivnosti izoenzimskih oblika laktat-dehidrogenaze.....	44
4.3.5.8. Određivanje osmotske fragilnosti eritrocita	44
4.4. Statistička obrada podataka	45
5. REZULTATI	46
5.1. Opšte karakteristike ispitivanih grupa krava	46
5.2. Mikrobiološka ispitivanja mleka.....	47
5.3. Ispitivanje osmotske fragilnosti eritrocita	47
5.4. Analiza lipidnog statusa	48
5.5. Analiza parametara oksidativnog stresa	49
5.5.1. Analiza stvaranja ROS preko koncentracije vodonik-peroksida.....	49

5.5.2. Analiza aktivnosti enzima superoksid-dismutaze.....	50
5.5.3. Analiza aktivnosti enzima katalaze	52
5.5.4. Analiza paraoksonazne aktivnosti enzima paraoksonaze-1	53
5.5.5. Analiza arilesterazne aktivnosti paraoksonaze-1.....	55
5.5.6. Analiza aktivnosti enzima mijeloperoksidaza.....	56
5.5.7. Analiza aktivnosti enzima laktoperoksidaza	58
5.5.8. Analiza ukupnog antioksidativnog kapaciteta	60
5.5.8.1. Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala	60
5.5.8.2. Određivanje sposobnosti neutralizacije ABTS radikala	61
5.6. Analiza parametara lipidne peroksidacije	63
5.6.1. Analiza koncentracije malondialdehida.....	63
5.6.2. Analiza koncentracije lipidnih-hidroperoksida	65
5.7. Ispitivanje parametara nitrozativnog stresa	66
5.7.1. Analiza koncentracije nitrita	66
5.7.2. Analiza koncentracije uznapredovalih proizvoda oksidacije proteina	68
5.7.3. Analiza koncentracije tiolnih grupa.....	70
5.8. Analiza enzima laktat-dehidrogenaze	71
5.8.1. Analiza ukupne aktivnosti enzima laktat-dehidrogenaze.....	71
5.8.2. Ispitivanje distribucije izoenzima laktat-dehidrogenaze u plazmi	73
5.9. Korelacione analize između pojedinih ispitivanih parametara.....	74
5.9.1. Analiza korelacione povezanosti PON1-ARE i TC.....	74
5.9.2. Analiza korelacione povezanosti PON1-ARE i HDL.....	75
5.9.3. Analiza korelacione povezanosti PON1-ARE i LDL	76
5.9.4. Analiza korelacione povezanosti PON1-ARE i PON1	76
5.9.5. Analiza korelacione povezanosti PON1-ARE i SCC	77
5.9.6. Analiza korelacione povezanosti PON1-ARE i LOOH.....	77
5.9.7. Analiza korelacione povezanosti PON1- ARE u krvnom i PON1- ARE u mlečnom serumu	78
5.9.8. Analiza korelacione povezanosti H ₂ O ₂ i SCC	79
5.9.9. Analiza korelacione povezanosti LOOH i SCC.....	80
5.9.10. Analiza korelacione povezanosti DPPH i SCC	80
5.9.11. Analiza korelacione povezanosti CAT i MPO	81
5.9.12. Analiza korelacione povezanosti MPO i LPO.....	81

5.9.13. Analiza korelacione povezanosti koncentracije NO ₂ ⁻ i SH-grupa.....	82
6. DISKUSIJA	83
6.1. Uticaj supkliničkih mastitisa izazvanih sa <i>S. aureus</i> na lipidni status krava.....	84
6.2. Uticaj supkliničkih mastitisa izazvanih sa <i>S. aureus</i> na stvaranje ROS.....	86
6.3. Uticaj supkliničkih mastitisa izazvanih sa <i>S. aureus</i> na aktivnost antioksidativnih enzima.....	87
6.4. Uticaj supkliničkih mastitisa izazvanih sa <i>S. aureus</i> na aktivnost paraoksonaza.....	89
6.5. Uticaj supkliničkih mastitisa izazvanih <i>S. aureus</i> na ukupan antioksidativni kapacitet.....	91
6.6. Analiza stepena lipidne peroksidacije i stepena hemolize eritrocita kod krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim sa <i>S. aureus</i>	92
6.7. Analiza indikatora oštećenja proteina kod krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim sa <i>S. aureus</i>	95
6.8. Uticaj supkliničkih mastitisa izazvanih <i>S. aureus</i> na aktivnost peroksidaza.....	97
6.9. Uticaj supkliničkih mastitisa izazvanih <i>S. aureus</i> na aktivnost laktat-dehidrogenaze.....	99
7. ZAKLJUČCI	102
8. LITERATURA	105

1. UVOD

Iako su mastitisi krava veoma aktuelna tema istraživanja, ovo oboljenje i dalje nanosi velike ekonomske gubitke govedarskoj proizvodnji širom sveta, usled smanjene produkcije mleka, visokih troškova terapije, odbacivanja mleka zbog upotrebe antimikrobnih preparata i prevremenog izlučivanja životinja (Olteacu i Broom, 2010; Taponen i sar., 2016; Ruegg, 2017; Aghamohammadi i sar., 2018). Prema kliničkom toku razlikujemo supkliničke i kliničke mastitise. Otkrivanje kliničkih mastitisa je relativno lako, ali je otkrivanje supkliničkih mastitisa (*eng.* subclinical mastitis - SCM) otežano, jer ne postoje vidljivi znaci oboljenja. Kod SCM postoji blaga upala mlečne žlezde koju ne možemo utvrditi adspekcijom. Vime i mleko su nepromenjeni. Sumnja se postavlja na osnovu pozitivnog Kalifornija mastitis testa (KMT) ili povećanog broja somatskih ćelija u mleku (*eng.* somatic cell count - SCC), a potvrđuje se nalazom patogenih mikroorganizama u laboratorijskim uslovima.

Mastitis može biti neinfektivne prirode, ali najčešće je bakteriološke etiologije. Trenutno u svetu, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), mikroorganizam koji veoma brzo stiče rezistenciju na nove antimikrobne preparate koji se uvode u terapiju (Beavers i Skaar, 2016), najčešće je izolovan patogen kod supkliničkih i hroničnih mastitisa krava (Tiezzi i sar., 2015). Poznato je da se *S. aureus* može izolovati kao deo normalne mikroflore sisara i ljudi, a najčešće se nalazi u nosu i na koži. Najvažniji rezervoar *S. aureus* kod mlečnih krava je inficirana mlečna žlezda. Najučestaliji putevi prenosa *S. aureus* sa inficirane na neinficiranu mlečnu žlezdu su preko opreme za mužu, krpa za brisanje vimena i rukama mužača. Bakterija *S. aureus* nakon ulaska u sisni kanal vimena, ulazi u epitelne ćelije i smešta se intracelularno. Kada se uzročnik veže na mlečnu mast unutar vimena, može dospeti duboko u parenhim (Côté-Gravel i Malouin, 2019).

Staphylococcus aureus čest je uzročnik SCM kod svih sisara, usled sposobnosti da izbegne urođeni i stečeni imunološki odgovor domaćina, kao i rezistencije na veliki broj antimikrobnih preparata (Bradley, 2002; Contreras i Rodriguez, 2011). Mastitisi izazvani *S. aureus* su veoma kontagiozni, i mogu se veoma brzo proširiti tokom muže na druge četvrti vimena iste krave, kao i na druge krave. Razvoj oboljenja može trajati nekoliko dana, nedelja i meseci. Ponekad, životinja može spontano ozdraviti, a supklinički tok u roku od nekoliko sati može preći u klinički. Zbog dugog perioda inkubacije, veliki deo stada može se inficirati ovim uzročnikom bez vidljivih kliničkih simptoma. Pored negativnih posledica na zdravlje životinja i

kvalitet mleka, *S. aureus* predstavlja značajnu pretnju za javno zdravlje, usled zoonotskog potencijala i rizika od intoksikacija preko hrane (Johler i sar., 2015; Kummel i sar., 2016; Ewida i Al-Hosary, 2020).

Poznato je da je SCC jedan od glavnih pokazatelja kvaliteta mleka. Svako mleko sadrži određeni SCC (epitelne ćelije, neutrofili, limfociti, makrofagi), a do znatnog povećanja SCC u mleku dolazi usled bakterijske infekcije, oštećenja tkiva ili drugih zapaljenskih procesa u tkivu mlečne žlezde (Ryšánek i sar., 2001; Lindmark-Månsson i sar., 2006; Abuelo i sar., 2013). Iako različiti faktori mogu dovesti do povećanja SCC u mleku, bakterijske infekcije vimena su najvažniji uzrok.

U mleku neinficiranog vimena od somatskih ćelija dominiraju makrofage, dok se kod mastitisa broj polimorfonuklearnih (PMN) leukocita povećava kao rezultat primarnog odgovora i prelaska leukocita iz krvi u mlečnu cisternu. Prema Andrei i sar. (2009) u mleku iz inficirane mlečne žlezde više od 90% somatskih ćelija čine neutrofili. Budući da najznačajnije povećanje SCC nastaje pri zapaljenskim procesima u vimenu, određivanje SCC u uzorcima mleka iz pojedinačnih četvrti vimena krava koristi se za dijagnostiku SCM, dok je u zbirnom mleku značajan parametar za ocenu njegovog kvaliteta.

Neutrofili i makrofage su prve ćelije koje infiltriraju mesto traume (Wellnitz i Bruckmaier, 2012), fagocituju strane čestice ili bakterije, oslobađaju sadržaj granula i predstavljaju značajan izvor reaktivnih kiseoničnih vrsta (*eng.* reactive oxygen species - ROS) (Su i sar., 2002). U borbi sa *S. aureus* oni stvaraju niz ROS koji modifikuju ili inaktiviraju ćelijske makromolekule, što kao rezultat ima bakteriostatski ili baktericidni efekat (Beavers i Skaar, 2016). Nastale ROS su štetne za bakterije, ali u zavisnosti od dužine i težine zapaljenskog procesa, moguća su oštećenja ćelija i tkiva domaćina (Hamed i sar., 2005).

Kao odgovor na stvaranje ROS, u isto vreme dolazi do aktiviranja antioksidativnih odbrambenih mehanizama (Beattie i sar., 2006), kojima se organizam štiti od štetnog dejstva i nekontrolisanog stvaranja ROS u metaboličkim procesima, i održava ih u niskim koncentracijama. Ukoliko dođe do poremećaja u ravnoteži između stvaranja slobodnih radikala (SR) i njihovog neutralisanja od strane antioksidativne zaštite organizma nastaje oksidativni stres, na nivou pojedinačne ćelije ili celog organizma (Lykkesfeldt i Svendsen, 2007), koji može dovesti do povećane oksidacije fosfolipida ćelijske membrane, proteina i DNK (Lopez-Pedraera i sar., 2017).

Jedan od strateških ciljeva na farmama mlečnih krava je otkrivanje mastitisa u što ranijem stadijumu, čime se sprečava širenje infekcije na druge četvrti vimena iste krave, na druge životinje, i proizvodi mleko neškodljivo za zdravlje ljudi.

U poslednje vreme povećan je interes za istraživanje oksidativnog stresa, kao i jedinjenja koja mogu umanjiti ili ukloniti oštećenja ćelija izazvana ovim stanjem. Pri proceni oksidoreduccionog statusa mogu se koristiti direktne i/ili indirektne metode, koje obuhvataju određivanje enzimskih i neenzimskih parametara antioksidativnog statusa, merenje koncentracija proizvoda oksidativne modifikacije proteina, lipida i DNK, kao i određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta (*eng.* total antioxidant capacity - TAC) samog organizma.

I dalje nedostaju jasni dokazi o uzročnoj vezi između povećanog nivoa oksidativnog stresa i patofizioloških promena vezanih za specifična oboljenja (Deaton, 2006), tako ni za mastitis krava. Prisustvo patogenih mikroorganizama u mlečnoj žlezdi povećava stvaranje SR i potrošnju TAC organizma. Tokom ove odbrambene reakcije može doći i do oksidativne modifikacije različitih biomolekula i lokalnog oštećenja tkiva, što dovodi do intenziviranja zapaljenja, oštećenja ćelija i tkiva vimena.

U literaturi gotovo da ne postoje podaci o povezanosti oksidativnih procesa i pojave mastitisa krava izazvanih *S.aureus*. Razumevanje oksidativnog stresa u patofiziologiji mastitisa može pomoći boljem razumevanju fundamentalnih mehanizama uključenih u metabolička oboljenja, što je značajno kod mlečnih krava, kod kojih sama laktacija nameće velike fiziološke zahteve na homeostatske mehanizme organizma.

Dobijeni rezultati trebalo bi da doprinesu boljem poznavanju patofiziologije mastitisa krava, mogućoj primeni ispitivanih parametara kao potencijalnih biomarkera zapaljenja i oksidativnog stresa u otkrivanju i prognozi mastitisa. Otkrivanje mastitisa u što ranijem stadijumu bolesti je veoma važno, kako bi se sprečilo širenje infekcije na druge četvrti vimena iste jedinke, kao i na druge životinje u zapatu, ranije postavila dijagnoza supkliničkog mastitisa, odredila težina patološkog procesa, omogućila prevencija bolesti, a sve u cilju smanjenja ekonomskih gubitaka i proizvodnje mleka koje se može upotrebiti u ishrani ljudi.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. MASTITIS KRAVA

Mastitis je složena multietiološka, akutna ili hronična inflamacija izvodnih kanala, parenhima ili intersticijuma jedne ili više mlečnih žlezda koje grade vime. Mastitis u užem smislu je definisan kao zapaljenje mlečne žlezde, koje je rezultat dejstva patogenih mikroorganizama (Zhao i Lacasse, 2008). Mastitisi su jedno od najvažnijih oboljenja mlečnih krava. Iako su veoma aktuelna tema istraživanja, ovo oboljenje i dalje nanosi velike ekonomske gubitke govedarskoj proizvodnji širom sveta, usled smanjene produkcije mleka, visokih troškova terapije, odbacivanja mleka zbog upotrebe antimikrobnih preparata i prevremenog izlučivanja životinja (Miller i sar., 1993; Chagunda i sar., 2006; Heikkilä i sar., 2012; Szweda i sar., 2014; Yang i Li, 2015; Taponen i sar., 2016). Najčešće se javljaju u prvim mesecima nakon telenja i pretežno oboljevaju visokomlečne krave (Ruegg, 2011; Rollin i sar., 2015).

Prema toku mastitisi mogu biti klinički, sa jasno uočljivim promenama na vimenu i/ili u mleku, i supklinički, kod kojih izostaju klinički vidljive promene, mleko nije promenjeno, a postoji blagi odgovor organizma na prisustvo mikroorganizama. Klinički tok mastitisa izazvanog *S. aureus* može varirati od blagog toka, do perakutnog, gde se javlja gangrena i ozbiljan poremećaj opšteg stanja.

Supklinički mastitisi su teži za otkrivanje, pošto ne dovode do vidljivih promena u mleku i vimenu. Krave sa SCM mogu predstavljati izvor infekcije za druge životinje, kao i za ljude (Pyörälä, 2003; Koivula i sar., 2007; Sharma i Jeong, 2013). Sumnja na SCM se postavlja na osnovu pozitivnog KMT, odnosno povećanja SCC, a potvrđuje se izolacijom i identifikacijom patogenih mikroorganizama u laboratorijskim uslovima.

Predisponirajući faktori za nastanak mastitisa krava, i uopšteno za povećanje SCC u mleku, analizirani su od strane brojnih autora (Peeler i sar., 2000; Breen i sar., 2009; Dufour i sar., 2011; Santman-Berends i sar., 2015). Raširenost određenih patogenih mikroorganizama, uzročnika mastitisa, u direktnoj je vezi sa nivoom menadžmenta na farmama mlečnih goveda, odnosno, tehničko-tehnološkog i organizacijskog procesa proizvodnje, ishrane i higijenskih standarda na farmi (Piepers i sar., 2011; Levison i sar., 2016).

Mastitis se kao i svaki drugi inflamatorni proces, razvija kao zaštitni odgovor mlečne žlezde i čitavog organizma na prisustvo patogena, fizičkog ili hemijskog nadražaja i oštećenja tkiva vimena. U patogenezi mastitisa ključnu ulogu ima urođeni imunski odgovor organizma kao prva linija odbrane vimena od prodora mikroorganizama. Inflamatorna reakcija, kao odgovor organizma na oštećenje tkiva je od vitalnog značaja i uključuje povećanu aktivnost fagocita, izlučivanje supstanci sa antimikrobnim dejstvom, fibrozu i promene u strukturi tkiva. Ponekad, pri manjim infekcijama, odbrambeni mehanizmi organizma i vimena nadvladaju patogene mikroorganizme i tada inflamacija spontano prolazi. Ipak, češće dolazi do oštećenja sekretornog dela vimena, koje posledično može biti zamenjeno fibroznim tkivom, pri čemu proces postaje ireverzibilan, inficirana četvrt ili celo vime gube funkciju proizvodnje i sekrecije mleka. Tokom mastitisa dolazi do promena u sastavu mleka, a stepen promena zavisi od uzročnika i inflamatornog odgovora mlečne žlezde i organizma (Pyörälä, 2003). Usled povećane propustljivosti krvnih sudova, tokom zapaljenskog procesa u vimenu, dolazi do prelaska jona, proteina i enzima iz krvi u mleko, smanjenja sintetskog kapaciteta mlečne žlezde, koje za posledicu ima smanjenje koncentracije pojedinih sastojka mleka (Korhonen i Kaartinen, 1995).

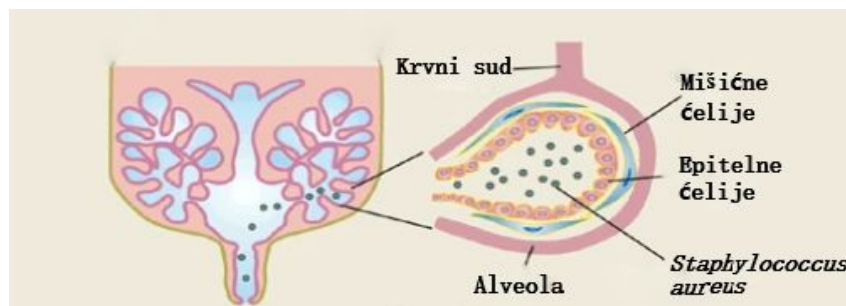
Kod krava, mastitis najčešće izazivaju različite bakterije, dok su drugi infektivni agensi od manjeg značaja. U odnosu na epidemiološke karakteristike, uzročnici mastitisa podeljeni su u dve grupe: patogeni sa glavnim rezervoarom u inficiranim četvrtima vimena i patogeni iz okruženja, koji se mogu naći u okolini u kojoj krave borave (Zecconi, 2010; Dufuor i sar., 2019). Od kontagioznih bakterijskih uzročnika mastitisa najznačajniji su *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Mycoplasma spp.* i *Corynebacterium bovis* (Olde Riekerink i sar., 2006). Od specifičnih bakterija koje mogu izazvati infekciju mlečne žlezde, trenutno u svetu najčešći uzročnik mastitisa je *S. aureus* (Taponen i Pyorala, 2009; Ryman i sar., 2015; Ismail, 2017). Mastitis krava izazvan sa *S. aureus* najčešće je supkliničkog i hroničnog toka (Akineden i sar., 2001; Zschöck i sar., 2005; Barkema i sar., 2006; Tiezzi i sar., 2015; Jørgensen i sar., 2016; Mir i sar., 2017). Razlog za veliku rasprostranjenost mastitisa izazvanih *S. aureus* povezan je sa karakteristikama ove bakterije, kao i opšteg nerazumevanja epidemiologije oboljenja (Zecconi, 2010). Poboljšanjem menadžmenta na farmama mlečnih krava, smanjuje se pojava mastitisa izazvanih sa *S. aureus*, ali je ovaj patogen i dalje veoma rasprostranjen (Scali i sar., 2015).

2.1.1. Mastitis krava izazvan sa *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus spada u specifične patogene uzročnike mastitisa. Ova bakterija je Gram pozitivna, nepokretna, okruglog oblika, veličine 0,8 - 1,0 μm . Na mikroskopskom preparatu se uočava u vidu grupica nepravilnog oblika, koje podsećaju na grozdove. Stafiloške su omnitropni, široko rasprostranjeni mikroorganizmi u prirodi. Prisutne su u vazduhu, vodi, zemlji i prašini. Među stafilokokama najznačajniji je *S. aureus* zbog izražene adaptivnosti i mogućnosti da uzrokuje različita patološka stanja, od blagih kožnih infekcija do smrtonosnih bakterijemija (McGuinness i sar., 2016).

Zbog svojih fenotipskih i genotipskih osobina, *S. aureus* ima veliki značaj u etiologiji mastitisa krava (Tkalec i sar., 2015). Najvažniji rezervoar *S. aureus* je inficirana mlečna žlezda, a uzročnik se najčešće prenosi sa krave na kravu priborom, aparatima za mužu i rukama mužača (Momtaz i sar., 2010; Russell, 2011).

U mlečnu žlezdu *S. aureus* dospeva preko sisnih kanala (Slika 1), umnožavajući se u cisterni, gde adhezija za epitelne ćelije mlečne žlezde predstavlja važan korak u procesu infekcije (DeGo i sar., 2002). *Staphylococcus aureus* poseduje specifične površinske proteine koji omogućavaju adheziju za fibronektin, fibrinogen, laminin i različite tipove kolagena tkiva domaćina (Zecconi, 2010).



Slika 1. Prodor *S. aureus* u vime (preuzeto i adaptirano sa <http://drainameducci.blogspot.com/2011/11/mastitis-in-dairy-cattle.html>)

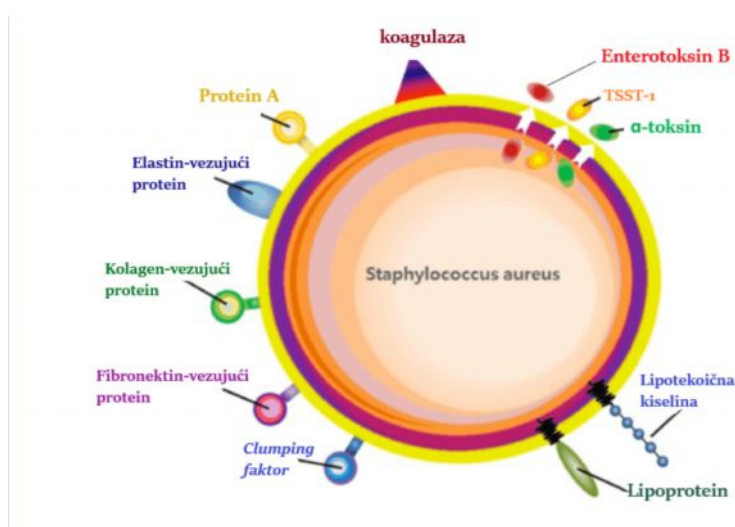
Nakon prodora u mlečnu žlezdu kroz sisni kanal i prilagođavanja na mikrouslove, ova bakterija se veoma brzo umnožava dovodeći do inflamatorne reakcije, koja za posledicu može imati i oštećenje tkiva (Sutra i Poutrel, 1994). Tokom umnožavanja *S. aureus* u vimenu, stvaraju se citotoksične materije koje dovode do patoloških promena, praćenih reakcijom urođenog imuniteta, uključujući infiltraciju neutrofilnih granulocita i inflamaciju. Oslobođeni citokini stimulatивно deluju na fibroblaste, makrofage i limfocite i otpočinju reparacioni procesi.

Infekcija bakterijom *S. aureus* najčešće se razvije u hronični supklinički mastitis, uz mogućnost povremenih blagih do umerenih kliničkih epizoda, koje su najčešće nakon telenja (Smith i sar., 2006). Pošto su *S. aureus* infekcije mlečne žlezde uglavnom po toku supkliničke (Barkema i sar., 2006), sa povećanjem SCC, ali bez vidljivih promena u mleku i vimenu, često ne budu prepoznate (Piccinini i sar., 2012). Mastitisi izazvani *S. aureus* imaju veoma nisku stopu izlečenja (Linder i sar., 2013). Na težinu infekcije i stopu izlečenja utiču graviditet, građa vimena, soj *S. aureus*, imunološki odgovor organizma i faktori spoljašnje sredine (Mallard i sar., 1998; Barkema i sar., 2006). Jednom inficirana životinja može izlučivati uzročnika tokom više laktacija. Nakon oporavka inficiranih četvrti vimena, postoji velika mogućnost reinfekcije sa *S. aureus* (Zadoks i sar., 2002).

Kontrola mastitisa izazvanih sa *S. aureus* predstavlja veliki problem. Da bi se sprečilo širenje infekcije, inficirane krave treba tretirati antimikrobnim preparatima ili odvojiti od zdravih krava (Lundberg, 2015). Stopa izlečenja mastitisa izazvanog sa *S. aureus* je veoma zabrinjavajuća, znatno varira kod SCM, od 4% do 92% (Timms, 1995; Owens i sar., 1997). Smatra se da je stopa izlečenja zadnjih četvrti vimena kod infekcije *S. aureus* niža u poređenju sa prednjim četvrtima (Barkema i sar., 2006). Takođe, visok broj bakterija u uzorcima mleka je povezan sa nižom mogućnošću izlečenja (Dingwell i sar., 2003; Deluyker i sar., 2005).

Stafilokokni mastitisi predstavljaju značajan problem zbog patogenosti i kontagioznosti uzročnika, njegovom perzistiranju u ćelijama, i slabih šansi za izlečenje oboljenja postojećim terapijama (Grunert i sar., 2017; Rainard i sar., 2018). Sojevi *S. aureus* se razlikuju u virulenciji (Fournier i sar., 2008, Piccinini i sar., 2009). *Staphylococcus aureus* poseduje veliki broj faktora virulencije koji su odgovorni za oštećenje ćelija i tkiva, za invazivnost bakterija i njihov prodor unutar ćelije, kao i faktore koji im omogućavaju preživljavanje i širenje sa mesta infekcije (Slika 2). Glavni faktori virulencije stafilokoka su: adherencija, produkcija toksina i enzima, bakterijska

pokretljivost, invazivnost i prisustvo kapsule. Adherencija i invazija epitela mogu značajno da doprinesu razvoju hroničnog toka infekcija izazvanih sa *S. aureus* (Barkema i sar., 2006). Stafilokokni enzimi hijaluronidaza i hijaluronliaza, razgradnjom hijaluronske kiseline olakšavaju širenje stafilokoka sa primarnog mesta infekcije, pojačavajući invanzivnost ovih bakterija (Götz i sar., 2006). *Staphylococcus aureus* ima sposobnost izbegavanja fagocitoze stvaranjem polisaharida, i stvarajući sluz sprečava neutrofile da ga prepoznaju i fagocituju. Kapsularni polisaharid stafilokoka sprečava vezivanje antitela za ove bakterije i indukuje oslobađanje citokina od strane monocita, epitelnih i endotelnih ćelija (Götz i sar., 2006).



Slika 2. Faktori virulencije *S. aureus* (preuzeto i adaptirano sa <https://microbeonline.com/virulence-factors-staphylococcus-aureus/>)

Iako se *S. aureus* smatra ekstracelularim patogenom, sve evidentnije je da ova bakterija može da preživi, i čak da se umnožava unutar fagocita, koje koristi kao transportno sredstvo za prodor dublje u parenhim vimena (Almeida i sar., 1996). Naglo umnožavanje *S. aureus* može dovesti do pojave gnoja u mleku i mikroapscesa u parenhimu vimena (Erskine i sar., 2003). Kapsula apscesa štiti uzročnika od delovanja antimikrobnih preparata, a moguće je i da privremeno smanji broj bakterija u uzorku mleka za bakteriološku analizu. Jedan od mehanizama pomoću kojih *S. aureus* izbegava odgovor organizma je i infiltracija u epitelne ćelije mlečne žlezde (Hébert i sar., 2010). Stvaranje biofilma, sesilne zajednice mikroorganizma koje su okružene specifičnim ekstraćelijskim matriksom predstavlja važan faktor virulencije *S. aureus*

(Melchior, 2006; Ster i sar., 2017). Biofilm obezbeđuje perzistenciju bakterijama i dovodi do upornog mastitisa hroničnog toka. Bakterijske ćelije koje čine biofilm zaštićene su od negativnih uticaja okoline, dejstva antimikrobnih preparata i efektorskih molekula imunskog sistema (Cucarella i sar., 2004; Melchior i sar., 2006; Scali i sar., 2015). Pored toga, *S. aureus* može da egzistira u varijanti specifičnih malih kolonija (*eng.* small colony variant - SCV), krijući se unutar ćelija domaćina i ne izazivajući veća oštećenja (Agarwal i sar., 2007; Kahl, 2014; Kahl i sar., 2016), ali sa mogućnošću izazivanja rekurentne infekcije (Gordon i Lowy, 2008). Značajan razlog neuspešnosti terapije mastitisa je sposobnost *S. aureus* da razvije multipnu rezistenciju na antimikrobne preparate pomoću brojnih mehanizama (Beavers i Skaar, 2016). Rezistencija bakterija roda *Staphylococcus* na β -laktamske antimikrobne preparate označena je kao rezistencija na meticilin. Odatle potiče i akronim MRSA (meticilin rezistentni *S. aureus*), iako meticilin nije više izbor za terapiju, niti za utvrđivanje rezistencije ovih bakterija. Genetska podloga rezistencije na meticilin posredovana je *mecA* genom koji kodira proizvodnju promenjenog proteina PBP2a koji veže penicilin, tako da se nijedan antibiotik iz grupe β -laktamskih antibiotika ne može vezati za odgovarajuće mesto na ćeljskoj membrani bakterije (Li i sar., 2009; Feßler i sar., 2010).

Pored negativnih posledica na zdravlje životinja i kvalitet mleka, *S. aureus* predstavlja značajnu pretnju za zdravlje ljudi, zbog zoonotskog potencijala i mogućih intoksikacija ljudi preko hrane (Johler i sar., 2015; Kummel i sar., 2016). Planovi za suzbijanje mastitisa izazvanih *S. aureus* moraju uključivati pravilan menadžment farme, pravilnu mužu, obaveznu dezinfekciju sisa nakon muže, i primenu biosigurnosnih mera, kako bi se sprečio unos i širenje ovog patogena (Barkema i sar., 2006).

2.1.2. Mehanizmi odbrane mlečne žlezde

Imunitet mlečne žlezde zavisi od koordinisanog delovanja nespecifičnog i specifičnog imuniteta, što uključuje kako anatomske karakteristike vimena, tako i ćelijske i humoralne odbrambene mehanizme. Primarna uloga imunskog sistema je prevencija naseljavanja mlečne žlezde bakterijama, eliminacija postojećih infekcija i uspostavljanje normalne funkcije tkiva mlečne žlezde.

Anatomski pravilno razvijeno vime i sisa, epitel sisnog kanala, Firstenbergova rozeta, kao i faktori rezistencije čitavog organizma (kondicija, konstitucija) su nespecifični faktori odbrane vimena, i predstavljaju prvu liniju odbrane mlečne žlezde od mikroorganizama. Zdrava i neoštećena koža, posebno na papilama, značajan je faktor koji doprinosi sniženju rizika od prodora mikroorganizama u vime. Pravilan oblik vimena, kao i veličina sisa i dužina sisnog kanala, smanjuju mogućnost pojave mastitisa (Vakanjac i sar., 2012). Višeslojni pločasti epitel sisnog kanala proizvodi keratin, koji oblaže sisni kanal i predstavlja mehaničku barijeru. Keratin je bogat esterifikovanim i neesterifikovanim masnim kiselinama koje imaju snažan antimikrobni efekat, sprečava prodor mikroorganizama u cisternu mlečne žlezde, kao i njihovo umnožavanje. Međutim, antimikrobna sposobnost keratina je ograničena, i mikroorganizmi mogu da prodru kroz sisni kanal i izazovu infekciju.

Nespecifični imunski sistem predstavlja prvu liniju odbrane mlečne žlezde i uključuje brojne odbrambene mehanizme koji se aktiviraju veoma brzo nakon kontakta sa bakterijama. U zavisnosti od efikasnosti nespecifičnih odbrambenih mehanizama, mikroorganizmi uzročnici mastitisa mogu biti neutralisani pre nego što nastanu promene u mleku ili tkivu mlečne žlezde. Brojne komponente koje su u vezi sa nespecifičnim imunskim odgovorom su identifikovane u mleku: ćelijske komponente (leukociti), humoralne (komplement, citokini), laktoferin, transferin, laktoperoksidaza/mijeloperoksidaza sistem, ROS, proteini akutne faze (haptoglobin, serum amiloid A) i širok spektar antimikrobnih peptida i proteina.

Komponente humoralne odbrane čine: laktoferin, transferin, lizozim, sistem komplementa, hemokini, citokini, faktori rasta i defenzini (Sordillo, 2018). Laktoferin je glikoprotein mleka koji konkuriše bakterijama vezujući za sebe gvožđe, i tako ga čini nedostupnim za bakterije. Pored bakteriostatskog dejstva, laktoferin ima sposobnost da zaštiti parenhim mlečne žlezde od štetnog delovanja ROS. U mlečnoj žlezdi laktoferin je uglavnom proizvod sekretornog epitela, a manje neutrofila. Transferin, protein koji takođe vezuje gvožđe, u mleku krava je zastupljen u niskim koncentracijama. Transferin u mleko prelazi iz krvi procesom transcitoze kod zdrave mlečne žlezde, dok kod masitisa u mleko dospeva procesom eksudacije krvne plazme (Rainard, 1982).

Lizozim je komponenta antibakterijskog sistema mleka i deluje sinergistički sa antitelima, komplementom i laktoferinim. Lizozim ima izraženiji inhibitory efekat prema Gram pozitivnim bakterijama.

Sistem komplementa ima centralnu ulogu u nespecifičnom imunskom odgovoru, jer je uključen u započinjanje i kontrolu zapaljenskih procesa, opsonizaciju površine bakterija, privlačenje i nakupljanje fagocita, prepoznavanje i ingestiju mikroorganizama od strane fagocita. Tokom laktacije, koncentracija komplementa u mleku kod zdrave mlečne žlezde je niska, a nešto više koncentracije se zapažaju na kraju laktacije, u kolostrumu i tokom involucije mlečne žlezde. Tokom mastitisa, baktericidna i hemolitička aktivnost sistema komplementa u mlečnoj žlezdi je povišena (Sordillo, 2018).

Citokini i oksilipidi reaguju sa krvnim sudovima u mlečnoj žlezdi, povećavaju vazodilataciju i propustljivost kapilara, što je značajno za migraciju leukocita iz krvi na mesto infekcije.

2.1.2.1. Somatske ćelije i njihova uloga u odbrani mlečne žlezde

Svako mleko sadrži određeni SCC (epitelne ćelije, neutrofili, limfociti, makrofage). Najveći procenat u mleku neinficiranog vimena čine makrofage (Dosogne i sar., 2003; Pyörälä, 2003; Lindmark-Månsson i sar., 2006), dok neutrofili čine 1 - 11% somatskih ćelija (Sandholm, 1995). Znatno povećanje SCC u mleku nastaje usled bakterijske infekcije, oštećenja tkiva ili drugih zapaljenskih procesa u tkivu mlečne žlezde (Ryšánek i sar., 2001; Lindmark-Månsson i sar., 2006; Abuelo i sar., 2013). Iako različiti faktori mogu dovesti do povećanja SCC u mleku, bakterijske infekcije vimena su najvažniji uzrok. Povećanje SCC je posledica prelaska ćelija bele krvne loze iz krvi u mlečnu žlezdu (Verdi i Barbano 1988; Sládek i sar., 2006; Suriyasathaporn i sar., 2006; Jóźwik i sar., 2012), pri čemu se procentualna zastupljenost ćelijskih tipova u mleku značajno menja, i procenat PMN čija je osnovna uloga zaštita vimena od bakterija prelazi i 90% (Kehrli i Shuster 1994; Zecconi i sar., 1994; Prin-Mathieu i sar., 2002).

Broj somatskih ćelija je usko povezan sa inflamacijom mlečne žlezde, tako da je prihvaćen kao internacionalni standard za ocenu kvaliteta mleka (Sloth i sar., 2003). Iako se za otkrivanje mastitisa mogu koristiti i drugi testovi kao što su: aktivnost N-acetil- β -D-glukozaminidaze, koncentracija laktoze, električna provodljivost mleka i drugi, određivanje SCC je zlatni standard u dijagnozi mastitisa (Pyörälä, 2003). U terenskim uslovima najčešće se kao test za određivanje SCC koristi Kalifornija mastitis test - KMT (Dingwell i sar., 2003). Ovaj test zasniva se na dejstvu alkilaril-sulfonata na DNK polimer iz leukocita, pri čemu se odvaja DNK, a

proteinski deo prelazi u gel. Usled gubitaka ćelijske membrane svih ćelija prisutnih u uzorku mleka, dolazi do reakcije DNK ovih ćelija sa KMT reagensom i formiranja gela. Kalifornija mastitis test predstavlja brz, siguran i jeftin test za ocenu SCC u svežem mleku (Dingwelli i sar., 2003).

Nakon što patogeni mikroorganizmi prodru u mlečnu žlezdu, bakterijski toksini, enzimi i komponente ćelijskog zida imaju direktan uticaj na funkciju epitelnih ćelija mlečne žlezde, ali takođe stimulišu brojne medijatore inflamacije. Zahvaljujući promenama u vaskularnom endotelu, PMN, kao što su neutrofilni i makrofage, migriraju ka žarištu infekcije i infiltriraju mesto traume (Wellnitz i Bruckmaier, 2012).

Tokom mastitisa PMN iz periferne krvi prelaze u mleko kroz epitelne ćelije mlečne žlezde kao odgovor na hemotaksični stimulus stvoren lokalno, kao reakcija na prisustvo mikroorganizama ili njihovih komponenti (Paape i sar., 1991; Caswell i sar., 1998). Usmereno kretanje PMN se odvija u pravcu gradijenta hemoatraktanata: komponenti komplementa (C3a i C5a), lipopolisaharida (LPS) i interleukina (IL-1, IL-2 i IL-8), koji se vezuju za specifične receptore ćelijske membrane PMN i tako usmeravaju njihovu migraciju (Paape i sar., 2003). Prelazak neutrofilnih granulocita iz cirkulacije se odvija kroz tri faze: kotrljanje, čvrsta adhezija i transendotelna migracija. Kotrljanje se odvija pod uticajem endotelnih ćelija koje reaguju na stimulanse citokina: tumor nekrotičnog faktora-alfa (TNF- α), IL-1 β i IL-17, koji se stvaraju tokom infekcije i inflamacije. Nakon aktivacije neutrofilnih granulocita, dolazi do ekspresije proinflamatornih citokina i medijatora koji dalje regulišu imunski odgovor.

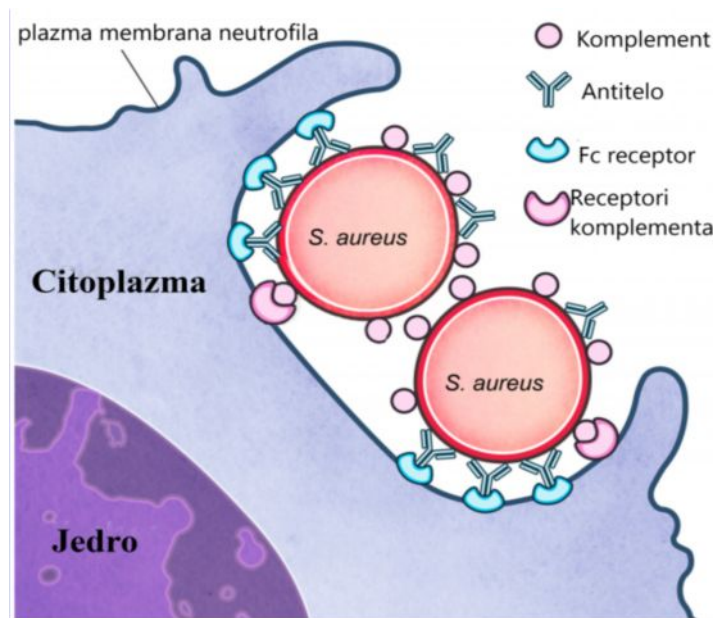
Smatra se da neutrofilni granulociti doprinose eliminaciji bakterija, pre svega, fagocitozom i intracelularnim ubijanjem, kao i oslobađanjem ROS i antimikrobnih polipeptida (Su i sar., 2002; Paape i sar., 2003). Fagociti prepoznaju *S. aureus* pomoću receptora za Fc fragment IgG antitela i receptora za C3b sistema komplementa (Slika 3).

Ingestiran unutar PMN, *S. aureus* biva izložen dejstvu niza baktericidnih mehanizama: kiseli pH, dejstvo vodonik-peroksida (H₂O₂), H₂O₂-zavisne peroksidaze, produkti metabolizma kiseonika, hidrolitički enzimi i lizozim. U trenutku vezivanja komponenti komplementa i imunoglobulina za površinske receptore na fagocitnim ćelijama, aktivira se i započinje oksidativni (respiratorni) prasak (De Coursey i Ligeti, 2005).

U interakciji sa inflamatornim agensima (citokini, bakterijski produkti) dolazi do aktiviranja nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (NADPH) oksidaza multiproteinskog

kompleksa u ćelijskoj membrani neutrofila i makrofaga, i oksidacije NADP u NADP⁺, uz otpuštanje elektrona (Slika 4).

Molekul kiseonika prima elektron i nastaje superoksid anjon radikal (O₂^{•-}), koji je vrlo nestabilan i spontano prelazi u H₂O₂. Superoksid anjon radikal i H₂O₂ predstavljaju dva glavna produkta NADPH-oksidaze. Iako nisu dovoljni za efikasan baktericidni učinak, pojačavaju dejstvo drugih kiseoničnih radikala sa izraženim antimikrobnim delovanjem.



Slika 3. Fagocitoza *S. aureus* (preuzeto i adaptirano iz McGuinness i sar., 2016)

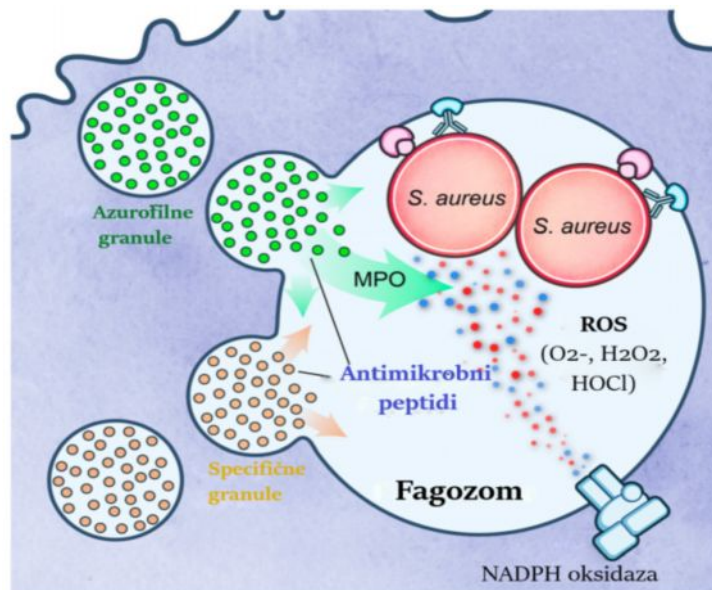
Slobodni radikali su potrebni za fagocitozu, jer lako razlažu molekule mikroorganizama koji napadaju ćelije (Stevanović i Borozan, 2012). Nastale reaktivne vrste modifikuju i inaktivišu makromolekule bakterijske ćelije, sprečavajući rast ili dovodeći do smrti bakterije (Beavers i Skaar, 2016).

Da bi mikroorganizam u fagozomu mogao biti uništen, potrebna je izuzetno toksična sredina. U zavisnosti od prisustva različitih stimulišućih faktora nastaju i drugi reaktivni metaboliti kiseonika: azot-oksidi (NO) i peroksinitrit (ONOO⁻), koji mogu stupiti u reakciju sa drugim kiseoničnim vrstama, stvarajući vrlo nepogodnu sredinu za mikroorganizme.

Nastale ROS i reaktivne vrste azota (*eng.* reactive nitrogen species - RNS), su štetne za bakterije, ali ukoliko njihov nastanak prevaziđe mogućnost neutralisanja od strane antioksidativne zaštite organizma, nastaje oksidativni stres, i u zavisnosti od dužine i težine

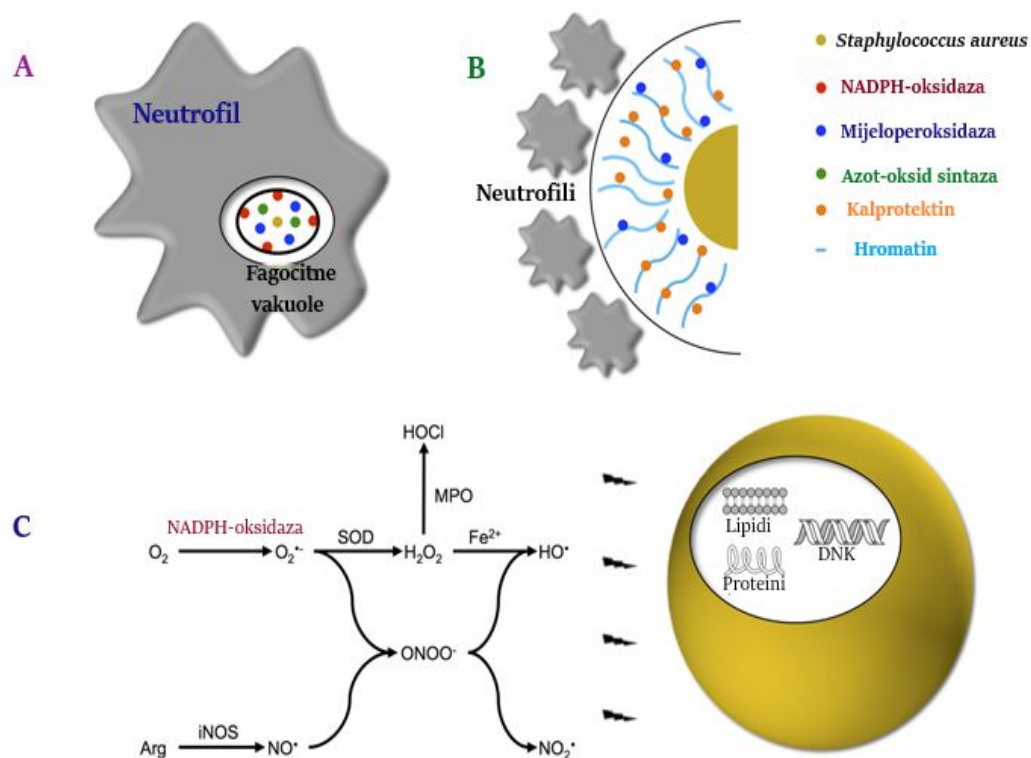
zapaljenskog procesa, oštećenje ćelija i tkiva domaćina (Björkman i sar., 2008). Prekomerno aktivirani neutrofilni granulociti predstavljaju opasnost po samog domaćina jer dovode do oslobađanja ROS, ali i čitavog niza nespecifičnih citotoksičnih komponenti, što posledično dovodi do oštećenja tkiva samog domaćina (Iba i sar., 2013).

U stalnom izazovu za preživljavanjem u prisustvu endogenih i egzogenih oksidanasa, stafilokoke su razvile određene mehanizme odbrane od oksidativnog stresa. *Staphylococcus aureus* za razliku od većine mikroorganizama može da sintetiše enzime: superoksid-dismutazu, katalazu i glutation-peroksidazu (Gaupp i sar., 2012), koji mu omogućavaju da neutrališe SR i preživi unutar neutrofila nakon fagocitoze.



Slika 4. Baktericidni mehanizmi unutar neutrofila (preuzeto i adaptirano iz McGuinness i sar., 2016)

Dokazano je i da lipoteikoična kiselina *S. aureus* može inhibirati spontanu apoptozu neutrofila, produžiti im životni vek, a samim tim i preživljavanje stafilokoka unutar neutrofila (Lotz i sar., 2004, Beavers i Skaar, 2016). Painter i sar. (2015) su dokazali da izlaganje *S. aureus* subletalnim dozama H_2O_2 dovodi do specifičnog, dozno zavisnog povećanja gentamicin rezistentnih SCV u populaciji stafolokoka, sojeva sa povećanom aktivnošću katalaze, znatno otpornijih na toksične efekte H_2O_2 . Ipak, prekid u sposobnosti bakterije da oseti, odgovori, ili popravi oštećenje nastalo oksidativnim stresom, rezultiraće osetljivošću na dalja oksidativna oštećenja i bakterijskom smrću (Slika 5).



Slika 5. Eliminacija *S. aureus* pomoću neutrofila (A) fagocitoza i izloženost ROS nastalim u reakcijama katalizovanim NADPH-oksidazom, mijeloperoksidazom i azot-oksid sintazom; (B) otpuštanje ekstracelularnih mreža neutrofila sa visokim sadržajem hromatina, kalprotektina i mijeloperoksidaza; (C) Oksidativni prasak i posledično oštećenje makromolekula *S. aureus*, uključujući lipide, proteine i DNK (preuzeto i adaptirano iz Beavers i Scaar, 2016).

2.3. LIPIDNI STATUS KRAVA

Lipidi su u organizmu značajan izvor energije, čine sastavni deo ćelijskih membrana i imaju značajnu ulogu u ćelijskoj signalizaciji. Osnovni oblik za prenos masnih supstanci su lipoproteini čija je klasifikacija izvršena na osnovu gustine čestice, na lipoproteine velike gustine (*eng.* high density lipoproteins - HDL), male gustine (*eng.* low density lipoproteins - LDL), srednje gustine (*eng.* intermediate density lipoproteins - IDL), jako male gustine (*eng.* very low density lipoproteins - VLDL) i hilomikrone. Poslednjih godina nekoliko studija je ukazalo na razlike u lipoproteinskoj strukturi i distribuciji lipoproteina kod različitih vrsta kičmenjaka

(Gardner i sar., 2003). Kod krava najzastupljeniji lipoprotein je HDL (>80% ukupnih lipoproteina), dok su VLDL veoma slabo zastupljeni, čineći samo 5% od ukupnih lipoproteina (Gardner i sar., 2003). Pored VLDL kod preživara su i LDL slabo zastupljeni (<10%) (Marcos i sar., 1990, Gardner i sar., 2003), za razliku od ljudi kod kojih LDL čini više od 40% ukupnih lipoproteina (Link i sar., 2007).

Lipidne komponente lipoproteina podložne su oksidativnim promjenama, a naročito LDL koji je vrlo osjetljiv na oksidativna oštećenja. U antioksidativnoj zaštiti lipida u cirkulaciji važnu ulogu imaju enzimi paraoksonaze, a pre svega paraoksonaza 1 (PON1) koja je preko tiolne grupe vezana za HDL, i u krvi uklanja lipidne perokside formirane na LDL i HDL (Halliwell i Gutteridge, 1999).

Veliki broj radova ukazuje da HDL ima značajnu metaboličku funkciju u neutralisanju SR, sprečavanju nastanka inflamacije i tromboze, doprinosi transportu malih molekula kao što su hormoni i/ili vitamini (Vickers i Remaley, 2014; Malara i sar., 2016). Ova lipoproteinska čestica ima značajnu antiinflamatornu i antioksidativnu funkciju (Rosenson i sar., 2013; Haraguchi i sar., 2014). Iako je poznata protektivna uloga HDL u zaštiti od ateroskleroze kod ljudi, u literaturi postoje podaci da u stanjima kao što su inflamacija, dijabetes i oksidativni stres (Rosenson i sar., 2013), HDL može da stimuliše sintezu SR (Reihmane i sar., 2012), postajući tako proaterogen i disfunkcionalan (Stancu i sar., 2012).

Poznato je da lipidom HDL čine 9 različitih fosfolipida i 4 sfingolipida, ali takođe i steroidi, estri holesterola i trigliceridi (Kontush i sar., 2013). Za HDL čestice vezano je 56 proteina, uključujući 10 apolipoproteina (Rezaee i sar., 2006). Inflamacija dovodi do promena u genskoj ekspresiji jetre pri čemu se posledično menja proteinski sastav HDL, odnosno dolazi do promena u proteomu HDL (Smith, 2010). Tokom inflamacije koncentracija apoolipoproteina, apoA-I na HDL je smanjena, dok je značajno povišena koncentracija serum amiloida A (SAA) i sekretorne fosfolipaze A2 (Smith, 2010).

2.4. OKSIDATIVNI STRES

Tokom evolucije, organizmi su se prilagodili na aerobne uslove života, i istovremeno pored stvaranja SR u metaboličkim procesima, dolazi do stvaranja zaštitnih antioksidativnih

mehanizama odbrane. Da bi se sprečilo moguće oštećenje ćelija i tkiva, i očuvala ravnoteža u organizmu, SR se moraju stalno uklanjati. Antioksidansi onemogućavaju stvaranje novih SR u organizmu, popravljaju oštećenja nastala njihovim štetnim delovanjem ili neutrališu u organizmu već stvorene reaktivne radikale (Stevanović i Borožan, 2012).

Kada postoji povećano stvaranje SR i smanjena sposobnost njihove neutralizacije i eliminisanja, nastaje stanje poznato kao oksidativni stres, na nivou pojedinačne ćelije ili celog organizma (Lykkesfeldt i Svendsen, 2007; Mavangira i Sordillo, 2018). Kao rezultat nastalog disbalansa, dolazi do oksidativnog oštećenja ćelija i tkiva, koje se može manifestovati oksidativnom modifikacijom ćelijskih makromolekula, apoptozom i strukturnim oštećenjem tkiva (Lykkesfeldt i Svendsen, 2007; Celi i Gabai, 2015). Ciljni makromolekuli za oksidativna oštećenja su lipidi, proteini i DNK (Celi i Gabai, 2015; Mavangira i Sordillo, 2018). Oksidativni stres je sastavni deo mehanizma nastanka svih hroničnih obolenja.

2.4.1. Slobodni radikali

Slobodni radikali su nestabilni proizvodi ćelijskog metabolizma koji se nalaze između oksidovanog i redukovano stanja i sadrže jedan ili više nesparenih elektrona, sa veoma kratkim poluživotom (Valko i sar., 2007). Težeći da postignu elektronsku stabilnost SR reaguju sa prvim susednim stabilnim molekulom, oduzimajući njegov elektron i započinju lančanu reakciju oksidacije koja dovodi do biohemijskih, strukturnih i funkcionalnih promena proteina, lipida, DNK i ćelijskih komponenti (Miller i sar., 1993; Davies, 2000; Lopez-Pedrerera i sar., 2017). Vezivanjem SR za biomolekule mogu nastati novi radikali sa mogućnošću pokretanja novog niza lančanih reakcija. Ovo remeti uobičajenu strukturu ćelije i njenu funkciju, doprinoseći patogenezi različitih bolesti (Rizzo i sar., 2013; McGrath i sar., 2018).

Pod pojmom reaktivne vrste, obuhvaćene su sve klase jedinjenja elektrofilnog karaktera visoke reaktivnosti. U zavisnosti od aktivnog centra SR se dele na reaktivne vrste sa kiseonikom (ROS), azotom (RNS), ugljenikom (*eng.* reactive carbonyl species - RCS) i sumporom (*eng.* reactive sulfur species - RSS). Najznačajnije reaktivne vrste u živim sistemima su ROS i RNS (Tabele 1 i 2) koje su proizvodi normalnog ćelijskog metabolizma, i u niskim koncentracijama korisne za žive organizme (Roth i sar., 2000; Dröge, 2002; Mavangira i Sordillo, 2018). Povoljni efekti SR se ogledaju u učešću u ćelijskoj signalizaciji, indukovanju mitogenog odgovora,

uklanjanju oštećenih ćelija, genskoj ekspresiji, kontroli tonusa krvnih sudova, uloga hemoatraktanata i aktivatora leukocita, uloga u fagocitozi, u normalnom ćelijskom rastu, programiranoj ćelijskoj smrti (apoptozi) i starenju ćelije (Halliwell i Gutteridge, 1999; Valko i sar., 2007). Međutim, u stanjima povećanog stvaranja ROS i RNS čije koncentracije prevazilaze kapacitete antioksidanasa za njihovu neutralizaciju, nastaje oksidativni i nitrozativni stres (Celi, 2011). Delujući kao oksidansi, ROS i RNS menjaju osobine molekula sa kojima stupaju u reakciju, remeteći njihovu funkciju, odnosno deluju toksično. Za razliku od fiziološkog stvaranja SR, nekontrolisanu inflamaciju karakteriše prekomerni nastanak i akumulacija SR, što znatno doprinosi razvoju oboljenja (Mavangira i Sordillo, 2018).

Glavni izvor ROS *in vivo* je aerobna respiracija, a najveće stvaranje je vezano za mitohondrije (respiratorni lanac), peroksizome i mikrozome (Buonocore i sar., 2010). Nastanak ROS u inflamatornim procesima dovodi do uništavanja invazivnih mikroorganizama. Naime, leukociti proizvode ROS tokom fagocitoze. Respiratorni prasak otpočinje odmah po unosu stranog tela u fagocit. U mitohondrijama fagocita dolazi do oksidacije molekulskog kiseonika u superoksid-anjon ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilni radikal ($\bullet OH$), hipohlorastu kiselinu (HClO), H_2O_2 i singlet kiseonik (1O_2). Istovremeno, lizozomalna mijeloperoksidaza omogućava nastanak HClO i $\bullet OH$. Nastali SR, svaki na svoj način, doprinose liziranju bakterijskih ćelija u roku od 30 do 60 minuta, uz veliki utrošak kiseonika. Iako je nastanak ROS esencijalan u zaštiti organizma od bakterijskih infekcija, pri njihovom prekomernom stvaranju tokom inflamatornog procesa, može doći i do oksidativne modifikacije biomolekula domaćina i oštećenja tkiva, kao neke vrste “kolateralne štete” (Valko i sar., 2007; Buonocore i sar., 2010).

Tabela 1. *Reaktivne vrste kiseonika*

Reaktivne vrste kiseonika – ROS	
Slobodni radikali	Neradikalske vrste
superoksid-anjon ($O_2^{\bullet-}$)	vodonik-peroksid (H_2O_2)
hidroksil radikal ($\bullet HO$)	hipohlorasta kiselina ($HClO$)
peroksil radikal ($ROO\bullet$)	ozon (O_3)
alkoksil radikal ($RO\bullet$)	singlet kiseonik (1O_2)
hidroperoksilni radikal ($HO_2^{\bullet-}$)	hidroperoksid ($ROOH$)

Tabela 2. *Reaktivne vrste azota*

Reaktivne vrste azota- RNS	
Slobodni radikali	Neradikalske vrste
azot-monoksid ($\bullet NO$)	azot-trioksid (N_2O_3)
azot-dioksid radikal ($NO_2\bullet$)	azotasta kiselina (HNO_2)
peroksinitrit ($ONOO^{\bullet-}$)	peroksinitrit-anjon ($ONOO^-$)
	alkil-peroksinitrit ($ROONO$)
	nitroksil-anjon (NO^-)
	nitrozil-katjon (NO^+)
	nitritni-anjon (NO_2^-)
	nitril-hlorid (NO_2Cl)

Vodonik-peroksid je najstabilniji intermedijarni proizvod redukcije kiseonika, koji u niskim koncentracijama svaraju svi aerobni mikroorganizmi, a nastaje spontanom ili

katalizovanom dismutacijom superoksid-anjon radikala (Juven i Pierson, 1996). Iako ne predstavlja pravi slobodni radikal, jer nema nespareni elektron, H_2O_2 može imati brojne toksične efekte (Stevanović i Borozan, 2012).

Glavno mesto stvaranja H_2O_2 u ćelijama su peroksizomi, u kojima se nalazi i enzim katalaza (CAT), koja ga razlaže do vode i molekuskog kiseonika i na taj način smanjuje njegovu toksičnost. Iako ima slaba oksidujuća i redukujuća svojstva H_2O_2 veoma lako difunduje kroz ćelijsku membranu (Al-Gubory i sar., 2010; Pinazo-Durán i sar., 2014), gde u prisustvu jona prelaznih metala, dvovalentnog jona gvožđa (Fe^{2+}) i jednovalentnog jona bakra (Cu^+) može primiti jedan elektron stvarajući toksičan $\bullet HO$.

Hidroksil radikal je izuzetno reaktivan i učestvuje u inicijaciji oksidacije biomolekula (Juven i Pierson, 1996; Hayyan i sar., 2016). Ovaj radikal kao neutralni oblik hidroksil anjona predstavlja najreaktivniji radikal u biološkim sistemima. Poluživot $\bullet HO$ je izuzetno kratak, svega 10^{-9} sekundi, tako da odmah reaguje sa praktično svim molekulima, uzrokujući velika oštećenja ćelija (Gutowski i Kowalczyk, 2013).

Vodonik-peroksid ima baktericidna svojstva samo pri visokim koncentracijama (Hyslop i sar., 1995). Brojne peroksidaze, kao što su mijeloperoksidaze, eozinofilne peroksidaze i laktoperoksidaze koriste H_2O_2 kao supstrat (Sies, 2017), pri čemu se H_2O_2 prevodi u baktericidne materije, kao što su $HClO$ i hipohalogeni radikal, u prisustvu unutarćelijskih jona halogena. Hipohlorasta kiselina je 100 do 1000 puta toksičnija od $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 (Kruidenier i Verspaget, 2002).

2.4.2. Mehanizmi odbrane od oksidativnog stresa

Da bi se očuvala ravnoteža u organizmu, i time sprečila moguća pojava neželjenih efekata, SR se moraju stalno uklanjati. Tokom evolucije, organizam se prilagodio na aerobne uslove života, a kao odgovor na stvaranje SR u isto vreme dolazi i do sinteze zaštitnih antioksidativnih mehanizama odbrane (Beattie i sar., 2006). Antioksidativna zaštita može delovati na nekoliko nivoa u ćeliji: sprečavanjem nastanka SR, njihovom neutralizacijom, popravkom oštećenja nastalih delovanjem SR i povećanim uklanjanjem oštećenih molekula (Halliwell i Gutteridge, 1999). Ovim mehanizmima organizam se štiti od štetnog dejstva i

nekontrolisanog stvaranja kiseoničkih vrsta u metaboličkim procesima, i održava ih u niskim koncentracijama.

Primarna antioksidativna zaštita podrazumeva antioksidanse koji sprečavaju inicijaciju i propagaciju SR, odnosno sprečavanje nastanka ROS, dok sekundarni nivo antioksidativne zaštite ima za cilj da neutrališe SR, pre nego što oštete biomolekule. Antioksidansi sekundarne antioksidativne zaštite obuhvataju enzime koji razgrađuju ili repariraju već nastale oksidovane proizvode u ćelijama (Halliwell i Gutteridge, 2007).

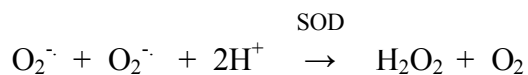
Antioksidativna zaštita predstavlja sistem odgovoran za neutralizaciju ROS i može se podeliti na:

- enzimsku antioksidativnu zaštitu, koja podrazumeva angažovanje enzima koji neutrališu slobodne radikale (superoksid-dismutaza, katalaza, enzimi glutation-redoks ciklusa),
- neenzimsku antioksidativnu zaštitu koja se sastoji od proteina koji vezuju potencijalno opasne jone gvožđa i bakra u svojoj neaktivnoj formi i na taj način sprečavaju stvaranje SR i brojnih niskomolekulskih jedinjenja. U neenzimske antioksidanse spadaju: feritin, transferin, laktoferin, albumin, L-askorbinska kiselina, α -tokoferol, karotenoidi, koenzim Q10, glutation, mokraćna kiselina, bilirubin i dr.

2.4.2.1. Enzimski mehanizmi antioksidativne zaštite

2.4.2.1.1. Superoksid-dismutaza (SOD)

Superoksid-dismutaza je metaloenzim prisutan u svim eukariotskim ćelijama. Ovaj enzim predstavlja prvu liniju odbrane ćelija od ROS, i ima značajnu ulogu u zaštiti od oksidativnih oštećenja. U fiziološkim uslovima kiseonik ne izaziva toksične efekte, jer ga SOD prevodi do manje aktivnog H₂O₂.



Dalju neutralizaciju nastalog H_2O_2 vrše katalaza i glutation-peroksidaza. Superoksid-dismutaza goveda je dimer molekulske mase 31-33 kDa (Abernethy i sar., 1974). Svaki monomer je sačinjen od približno 153 aminokiseline, jednog disulfidnog mosta, i jona Cu^{2+} i Zn^{2+} . Struktura enzima SOD u mleku krava identična je sa strukturom ovog enzima u eritrocitima (Fox i Kelly, 2006). Kod ljudi su identifikovane tri izoenzimske forme SOD: citosolna (Cu,Zn-SOD), mitohondrijalna (Mn-SOD) i ekstracelularna (EC-SOD).

2.4.2.1.2. Katalaza (CAT)

Katalaza je jedan od najefikasnijih enzima u živom svetu. Ovaj antioksidativni enzim sastavljen je od četiri subjedinice, od kojih svaka u aktivnom mestu sadrži hem grupu. Po strukturi CAT je homotetramer molekulske mase od 240 kDa koji u svom aktivnom centru ima Fe^{3+} vezano za porfirin-hem grupu (Scandalios, 2005). Osnovna uloga ovog antioksidativnog enzima je razlaganje neradikalskog H_2O_2 do H_2O i molekuskog kiseonika (O_2). Katalaza ima važnu ulogu u sistemima koji su se razvili u aerobnoj sredini zbog svoje široke distribucije, evolutivne očuvanosti i brze aktivnosti. U eukariotskim ćelijama CAT se predominantno nalazi u peroksizomima, a prisutna je i u citosolu i mitohondrijama (Scandalios, 2005).

2.4.2.1.3. Paraoksonaza 1 (PON1)

Paraoksonaza je kalcijum zavisna esteraza vezana za HDL (Blatter i sar., 1993; Miyamoto i sar., 2005; Gugliucci i sar., 2014), i kod sisara se prvenstveno sintetise u jetri odakle se izlučuje u krv (Hassett i sar., 1991). Paraoksonaza 1 je sakupljač SR i njihovih metaboličkih proizvoda, i deo je enzimskog antioksidativnog sistema organizma (Gugliucci i sar., 2013). Ovaj enzim ima višestruku ulogu u različitim biohemijskim putevima, kao što je zaštita od oksidativnih oštećenja i lipidne peroksidacije, doprinos urođenoj imunološkoj zaštiti organizma, detoksikaciji reaktivnih molekula, bioaktivaciji lekova i regulaciji ćelijske proliferacije i apoptoze.

Većina PON1 u serumu je vezana za apolipoproteine, apoA-I (Davidson i sar., 2009) i apo-J (Haraguchi i sar., 2014). Apolipoproteini nisu neophodni za vezivanje PON1 za HDL, ali su važani za stabilizaciju enzima i njegovu aktivnost (Aviram i Rosenblat, 2004; James i sar., 2004; Deakin i sar., 2011). HDL-vezani enzim PON1 štiti i odlaže oksidaciju HDL i LDL i tako

sprečava pojavu i progresiju oksidativnog stresa (Aviram i Vaya, 2013; Ceron i sar., 2014; Mackness i Mackness, 2014). Paraoksonaza 1 se smatra i negativnim proteinom akutne faze, čija je koncentracija smanjena tokom inflamatornih procesa (Bionaz i sar., 2007, Novak i sar., 2010).

Naziv paraoksonaza potiče od sposobnosti ovog enzima da hidrolizuje paraokson (dietil-p-nitrofenil-fosfat), toksični okson metabolit parationa (Richter i sar., 2009). Trenutno za procenu aktivnosti PON1 postoji velika heterogenost u izboru supstrata, kao i u uslovima pod kojim se izvode analize sa svakim supstratom. Najčešće se za merenje aktivnosti PON1 u laboratorijskim uslovima upotrebljavaju paraokson (paraoksonazna aktivnost) i fenil-acetat (arilesterazna aktivnost). Paraokson je veoma nestabilan i izuzetno toksičan (Camps i sar., 2009), može prouzrokovati brzo i ozbiljno organofosfatno trovanje (Mogarekar i Chawhan, 2013). Smatra se da je fenil-acetat manje toksičan od paraoksone (Camps i sar., 2009), iako i sa njim treba rukovati uz odgovarajuće mere opreza. Paraoksonaza hidrolizuje i druge supstrate iz grupe organofosfornih jedinjenja, kao što su hlorspirifos, diazinon, sarin ili soman (Davies i sar., 1996). Laktone mogu biti upotrebljeni u analizi PON1 (Khersonsky i Tawfik, 2006, Teiber i sar., 2008) i razmatrani su kao primarni supstrati PON1 (Richter i sar., 2009). Koji supstrat će se upotrebiti za merenje aktivnosti PON1 zavisi od kliničke senzitivnosti, specifičnosti, manje toksičnosti i manjeg uticaja polimorfizma (Ceron i sar., 2014). Kod ljudi aktivnost i koncentracija PON1 pokazuju značajne interindividualne varijacije. Razlog ovome je činjenica da je do danas opisano više od 160 polimorfizama u regiji gena *pon1* (Marchegiani i sar., 2008). Najviše istraživani su polimorfizmi u kodirajućoj regiji Q192 i L55M (Costa i sar., 2005).

Kod mlečnih krava aktivnost PON1 kao biomarkera predložena je u dijagnozi laminitisa, metritisa i masne jetre mlečnih krava (Bionaz i sar., 2007, Schneider i sar., 2013). Snižena aktivnost PON1 opisana je pri inflamatornim stanjima mlečnih krava kao što su metritis (Bionaz i sar., 2007), rane postpartalne infekcije uterusu (Schneider i sar., 2013), mastitis (Turk i sar., 2012), masna jetra (Farid i sar., 2013) i ketoza (Cao i sar., 2017). Snižena aktivnost PON1 opisana je i kod mlečnih krava u tranzicionom periodu (Turk i sar., 2013; Mayasari i sar., 2017) kada je povećan nastanak ROS (Bionaz i sar., 2007).

2.4.2.1.4. Mijeloperoksidaze (MPO)

Mijeloperoksidaza je član superfamilije hem peroksidaza i jedan je od najzastupljenijih proteina u neutrofilnim leukocitima (Nicholls i Hazen, 2005), čineći približno 5% ukupnih proteina neutrofila (Klebanoff i sar., 2013). Ovaj enzim je deo superfamilije II peroksidaza kojoj pripadaju i laktoperoksidaze (LPO), eozinofilne peroksidaze (EPO) i peroksidaze tireoideje (TPO). Neutrofilnu peroksidazu prvi je prečistio Agner 1947. godine iz gnoja kod pasa, i zbog njene intenzivne zelene boje nazvao je verdoperoksidaza. Danas je poznato da MPO uglavnom potiče iz azurofilnih granula leukocita, a u manjem stepenu iz primarnih lizozoma monocita (Aratami, 2018). Mijeloperoksidaza ima značajnu baktericidnu ulogu (Smith, 2010; Klebanoff i sar., 2013; Nauseef, 2014; Aratami i sar., 2018). Kada fagocituju bakterije, neutrofili podležu respiratornom prasku, izazvanom NADPH-oksidadnim kompleksom, koji se agregira na membrani fagozoma. Vodonik-peroksid neophodan za ovu reakciju dobija se dismutacijom superoksid-anjon radikala, pod katalitičkim dejstvom SOD (Klebanoff i sar., 2013). Mijeloperoksidaza katalizuje reakciju halogenih (Cl^- , Br^- i I^-) i pseudohalogenih (tiocijanat - SCN^-) jona sa H_2O_2 , pri čemu nastaju hipohlorasta (HOCl), hipobromasta (HOBr) i hipotiocijanatna (HOSCN) kiselina. Zbog veoma prisutnog hloridnog jona (Cl^-) u biološkim sistemima (Pattison i sar., 2012; Kato, 2016, Aratami, 2018), najznačajniji proizvod je HOCl koja je potentniji oksidans i ima jače citotoksično delovanje od superoksidnog-anjona i H_2O_2 . Mijeloperoksidaza je jedini enzim u organizmu sisara sposoban da katališe ovu reakciju, a HOCl je dominantana za liziranje mikroorganizama koje se odvija u fagozomima neutrofila. Mijeloperoksidaza je enzim koji povezuje oksidativni stres i inflamaciju. Pored baktericidnog efekta, poznato je da MPO može dovesti do oksidativnih ili hemijskih modifikacija lipoproteina (Nicholls i Hazen, 2009). Pošto MPO generiše nastanak reaktivnih radikala kao što su: HOCl , hloramini, tirozil radikali, azot-dioksid, koji su sposobni da iniciraju proces peroksidacije lipida i proteina (Celi i Gabai, 2015), može dovesti do poremećaja ćelijskih funkcija i doprineti oštećenju tkiva (Zhang i sar., 2002; Winterbourn, 2002; Nicholls i Hazen, 2005; Stanković i Majkić-Singh, 2011; Winterbourn i sar., 2016; Aratami, 2018). Mijeloperoksidaza preko HOCl i HOSCN dovodi do nitrovanja i halogenovanja tirozinskih ostataka što ima za posledicu disfunkciju HDL čestica, kao i redukovano antiinflamatorno delovanje apoA-I (Nicholls i Hazen, 2005).

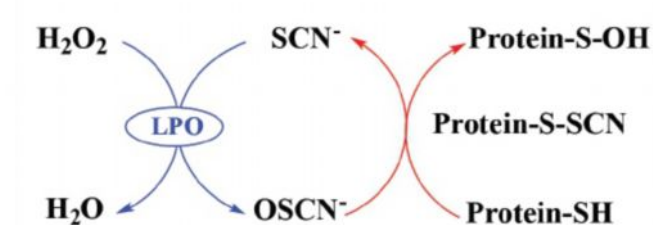
De Jong i sar. (2017) su identifikovali protein bakterije *S. aureus* koji se specifično vezuje i inhibira humanu MPO. Autori su ovaj protein nazvali “stafilokokni inhibitor peroksidaza” (eng. staphylococcal peroxidase inhibitor - SPIN), i utvrdili da inhibira MPO tako što sprečava pristup H_2O_2 aktivnom mestu ovog enzima.

Primena MPO kao biomarkera u dijagnostici akutnih bakterijskih infekcija razmatrana je u humanoj medicini (Kulander i sar., 2001).

2.4.2.1.5. Laktoperoksidaze (LPO)

Laktoperoksidaze pripadaju grupi peroksidaza koje sadrže hem, pored MPO, EPO i TPO. Poređenjem sekvenci humanih LPO sa MPO, EPO i TPO utvrđena je identičnost od 57%, 58% i 46% prema redosledu navođenja (Sharma i sar., 2013).

Pored mleka, LPO se nalazi u pljuvački, suzama i drugim ekskretornim tečnostima. Ovaj enzim je veoma značajan u inaktivaciji širokog spektra mikroorganizama, i samim tim važan deo odbrambenog sistema organizma (Sharma i sar., 2013). Pored antibakterijske aktivnosti LPO pokazuje antivirusnu (Pourtois i sar., 1990; Mikola i sar., 1995) i antigljivičnu aktivnost (Benoy i sar., 2000; Ahariz i Courtois, 2010).



Slika 6. Mehanizam aktivacije peroksidaza

Laktoperoksidaze pomoću H_2O_2 katalizuju oksidaciju halogena, pseudohalogena i organskih aromatičnih molekula do $HOCl$ i $HOSCN$ (Furtmuler i sar., 2004). Pored SCN^- koji se smatra fiziološkim supstratom za LPO (Kussendrager i Van Hooijdonk, 2000), one mogu da

vezuje i druge neorganske jone, kao što su I^- , Br^- , Cl^- , F^- , NO_2^- , CN^- (Ferrari i sar., 1997), ali je afinitet LPO za vezivanje sa SCN^- , I^- , Br^- , Cl^- znatno jači u poređenju sa drugim anjonima (Sharma i sar., 2013). Sistem LPO/ SCN^- / H_2O_2 u svežem mleku je neaktivan (Althaus i sar., 2001; Silanikove i sar., 2005), i za aktivaciju je neophodno prisustvo egzogenog SCN^- i H_2O_2 (Slika 6) u koncentracijama koji prelaze njihove fiziološke vrednosti u mleku (Wolfson i Sumner, 1993). Laktoperoksidaze učestvuju u oksidaciji tiolnih grupa proteina bakterija, i dovode do oštećenja njihove ćelijske membrane, i na taj način sprečavaju bakterijski rast i proliferaciju. (Sisecioglu i sar., 2010).

2.5. Oštećenja biomakromolekula usled oksidativnog stresa

Tokom inflamacije dolazi do infiltracije neutrofila, monocita, makrofaga i limfocita koji oslobađaju nove ROS, brojne enzime (elastaze, kolagenaze, hidrolaze, fosfataze), kao i hemijske medijatore (eikosanoide, citokine, hemokine, azot-monoksid), izazivajući oštećenje tkiva i dalju progresiju pro-oksidativnog stanja, stvarajući na taj način “začarani krug” između oksidativnog stresa i inflamacije. Oksidativni stres može biti posledica, ali i okidač inflamacije.

Većina SR su visoko reaktivne vrste i imaju veoma kratak poluživot od svega nekoliko sekundi. Nasuprot tome, poluživot lipida, proteina, ugljenih hidrata i nukleinskih kiselina nakon dejstva SR traje od nekoliko sati do nekoliko nedelja, što ih čini stabilnijim markerima oksidativnog stresa.

2.5.1. Lipidna peroksidacija (LP)

Najizraženiji negativni efekat delovanja SR je lipidna peroksidacija (LP), pri kojoj dolazi do oksidacije polinezasićenih masnih kiselina koje se nalaze u sastavu lipida svih bioloških membrana (Boudjellaba i sar., 2018). Intenzivna LP u biološkim membranama dovodi do gubitka fluidnosti, opadanja vrednosti membranskog potencijala, povećanja permeabilnosti prema jonima, moguće rupture ćelije i otpuštanja njenog sadržaja. Ozbiljnost ćelijskog oštećenja zavisi od toga na kojim membranama (organele, jedro) se odvija LP. Stepem LP u mnogome zavisi od

stepena antioksidantne zaštite kojom raspolaže organizam u momentu kada se stvaranje SR poveća.

Lipidna peroksidacija je autokatalitički, progresivan i najčešće ireverzibilan proces koji protiče kroz tri faze: inicijaciju, propagaciju i terminaciju. Proces oksidacije lipida započinje fazom inicijacije u kojoj visoko reaktivni oksidans oduzima atom vodonika polinezasićenoj masnoj kiselini pri čemu nastaje alkilni-, odnosno lipidni-radikal. Ukoliko inicijacija nije kontrolisana odbrambenim mehanizmima, ona može započeti lančanu reakciju koja može dovesti do uništenja okolnih molekula. Sledeća je faza propagacije u kojoj peroksil-radikal iz susednog molekula nezasićene masne kiseline oduzima vodonik, pri čemu nastaje lipidni-hidroperoksid (LOOH) i novi alkil-radikal. Hidroperoksidi su glavni primarni proizvodi LP posredovani slobodnim radikalima. Na taj način se pokreće autolitički ciklus LP. Nastali peroksil-radikali su nestabilni molekuli čijom daljom konverzijom nastaju stabilniji proizvodi, kao što su izoprostani i aldehidi. Lipidna peroksidacija se završava konverzijom H_2O_2 u sekundarne neradikalske molekule: ugljenvodonike, aldehide, alkohole i ketone. Najpoznatiji toksični aldehydni produkti lipidne peroksidacije su 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) i malondialdehid (MDA). Iako se zovu „završni proizvodi lipidne peroksidacije“, u određenim uslovima mogu nastaviti lančanu reakciju oksidativnih oštećenja. Malondialdehid se može unakrsno vezati za proteine i fosfolipide ćelijske membrane, intenzivirajući oksidativna oštećenja biomolekula. Proizvodi LP imaju dug poluživot, veoma su reaktivni i mogu stupiti u reakciju sa okolnim molekulima i tako oštetiti ćelije, pa i dovesti do ćelijske smrti. Oni su proaterogeni, proinflamatorni, potencijalno toksični i mutageni molekuli.

2.5.2. Oksidativne modifikacije proteina

Proteini predstavljaju značajne ciljne molekule za ROS/RNS zbog visoke zastupljenosti u strukturama bioloških sistema i zbog uključenosti u većinu funkcionalnih procesa unutar ćelija (Dalle-Donne i sar., 2006). Poznato je da proteini mogu neutralisati više od 75% SR, kao što je •HO (Gebicki i Gebicka, 1997).

Do oštećenja proteina dolazi na direktan ili indirektan način. Oksidacija proteina se definiše kao kovalentna modifikacija proteina izazvana direktnim delovanjem ROS, ili indirektno reakcijom proteina sa sekundarnim proizvodima nastalim u toku reakcija drugih bioloških

makromolekula sa SR (Shacter, 2000). Nitrozativni stres se može definisati kao stanje u kome stvaranje RNS prevazilazi sposobnost bioloških sistema da spreče oksidativne promene na proteinima (Stevanović i Borozan, 2012).

Do značajnih promena u ćelijskoj aktivnosti mogu da dovedu i relativno male strukturne modifikacije proteina (Shacter, 2000). Nastale promene u konformaciji proteina dovede do promene enzimske aktivnosti, transportne uloge, i utiču na vezivanje liganada za receptore, mogu da izazovu međuproteinske interakcije, degradaciju proteina, i nastanak novih antigena (Halliwell i Whiteman, 2004; Mavangira i Sordillo, 2018). Aminokiselinske rezidue proteina razlikuju se po stepenu osetljivosti na ROS, a najosetljivijim se smatraju cistein i metionin (Buonocore i sar., 2010). Oksidativne modifikacije proteina, odnosno aminokiselina, podrazumevaju promenu primarne strukture usled reakcija na bočnim lancima aminokiselinskih ostataka, fragmentaciju polipeptidnih lanaca i konverziju u veće molekulске agregate. Degradacija oksidovanih proteina zavisna je od prisustva i aktivnosti specifičnih proteaza, kao i stepena oksidativnih modifikacija proteina. Ekstremno oksidovani proteini skloni su formiranju agregata otpornih na dejstvo proteolitičkih enzima (Catalgol i Grune, 2009). Oksidovani proteini mogu da akumuliraju “dokaze” oksidativnog insulta, a imajući u vidu da imaju znatno dug poluživot, predstavljaju stabilne markere oksidativnog stresa (Dean i sar., 1997).

U zaštiti proteina od oksidativnih oštećenja, značajnu ulogu imaju tiolne (sulfhidrilne, SH-) grupe. Tiolne grupe spadaju u najvažnije endogene neenzimske antioksidanse, jer one prve podležu oksidaciji u ćelijama i sprečavaju oksidaciju drugih funkcionalnih grupa enzima i proteina, i regenerišu druge antioksidanse do njihovog aktivnog stanja. Smanjen sadržaj slobodnih SH-grupa u ćeliji tumači se kao povećanje oksidativnog stresa, i koristi kao jedan od indikatora stepena oksidativne modifikacije proteina (Dalle-Donne i sar., 2006).

Određivanje koncentracije nitrita (NO_2^-) i nitrata u krvi često se koristi kao indeks aktivnosti NO-sintaze i za indirektno određivanje koncentracije azot-monoksida (Bryan, 2006). Azot-monoksid ($\bullet\text{NO}$) učestvuje u brojnim fiziološkim procesima, uključujući neurotransmisiju, regulaciju krvnog pritiska, relaksaciju glatkih mišića, regulaciju imunskog sistema i odbranu organizma. Aktiviranjem imunskog sistema, posebno makrofaga, povećava se koncentracija stvorenog $\bullet\text{NO}$, neophodna za odbranu organizma od različitih patogenih uzročnika. Iako sam nema veliku reaktivnost, $\bullet\text{NO}$ u prisustvu O_2 ili $\text{O}_2\bullet^-$ mogu nastati reaktivnije vrste, kao što su NO_2^- i peroksinitritns kiselina (ONOOH) (Cardozo i sar., 2014). Peroksinitritni anjon (NOO^-) je

veoma reaktivan, pored antimikrobne aktivnosti može da dovede do oksidativnih oštećenja biomolekula (Cardozo i sar., 2014).

U literaturi postoje podaci da su mastitisi povezani sa povišenim koncentracijama metabolita •NO, nitrita i nitrata, kao i oksidativno modifikovanih organskih komponenti, ukazujući na značaj nitrozativnog stresa tokom masitisa (Titov i sar., 2010; Piotrowska-Tomala i sar., 2012). Smatra se da je konverzija NO_2^- u nitrata delovanjem CAT u mleku osnovni mehanizam u zaštiti od prekomernog nitrozativnog stresa u mleku (Silanikove i sar., 2012). U visoko kvalitetnom mleku koncentracija NO_2^- je svega nekoliko μM , a značajno se povećava pri zapaljenskom procesu (Silanikove., 2014). Istraživanja su pokazala da •NO u mleku vodi poreklo iz epitelijalnih ćelija mlečne žlezde i somatskih ćelija mleka (Bouchard i sar., 1999; Boulanger i sar., 2001). Baktericidni efekat •NO u mleku je povezan sa konverzijom NO_2^- do azot-dioksid radikala ($\text{NO}_2\bullet$) u H_2O_2 -zavisnoj reakciji, delovanjem LPO.

Uznapređovali proizvodi oksidacije proteina (*eng.* advanced oxidation protein products - AOPP) su novi marker oksidativnog oštećenja proteina i nova klasa medijatora inflamacije (Hanasand i sar., 2012). Oni su prvi put su opisani kod pacijenata na dijalizi, kao marker oksidativnog stresa kod hronične uremije (Witko-Sarsat, 1996). Povišena koncentracija AOPP opisana je i kod reumatoidnog artritisa (Baskol i sar., 2006), lupusa (Lozovoy i sar., 2011) i kardiovaskularnih oboljenja kod ljudi (Barsotti i sar., 2011).

Većina AOPP nastaje usled povećanog oslobađanja MPO iz aktiviranih fagocita i nastalih hloramina i HOCl (Capeillere-Blandin i sar., 2004; Catakay, 2005). Hipohlorasta kiselina ima značajno baktericidno dejstvo, ali takođe lako stupa u reakciju sa proteinima pri čemu se povećava oštećenje tkiva domaćina na mestu zapaljenske reakcije (Chapman i sar., 2003; Bordignon i sar., 2014). Primarno poreklo AOPP je oksidativno promenjen albumin (Witko-Sarsat, 1996), ali mogu nastati i iz fibrinogena i kolagena (Colombo i sar., 2015). Kod ljudi za nastanak AOPP oksidovani fibrinogen prepoznat je kao ključni protein (Selmececi i sar., 2006).

Tačna struktura AOPP još nije poznata, ali se zna da su sastavljeni od proteinskih proizvoda koji sadrže ditirozin, pentozidin i karbonil koji nastaju u reakciji proteina sa HOCl formirane u MPO-katalizovanoj reakciji. U organizmu se razlikuju dve vrste AOPP: AOPP niske molekulske mase koji sadrže monomerni oblik albumina, i AOPP visoke molekulske mase koji nastaju usled sklonosti albumina da stvara agregate preko disulfidnih mostova i/ili ditirozinskog umrežavanja. Nastanak AOPP je ireverzibilan proces, nastala formacija ne može se razgraditi

proteolitičkim enzimima, niti im se antioksidansima može smanjiti koncentracija (Gabai i sar., 2019).

Povišene koncentracije AOPP kod krava sa mastitisom mogu biti odraz supkliničke infekcije, a određivanje koncentracije AOPP može biti značajno za procenu aktivnosti fagocita (Gabai i sar., 2019). Koncentracija AOPP se povećava sa težinom oboljenja, i može se koristiti za praćenje progresije i prognoze bolesti.

2.6. ULOGA OKSIDATIVNOG STRESA U RAZVOJU BOLESTI KOD MLEČNIH KRAVA

Za razliku od mnogobrojnih istraživanja oksido-redukcionog statusa u humanoj medicini, preživari su tek od nedavno predmet istraživanja na ovom polju. U poslednje vreme povećan je interes za istraživanje oksidativnog stresa, kao i molekula koji mogu umanjiti ili ukloniti oštećenja ćelija prouzrokovana oksidativnim stresom kod farmских životinja (Lykkesfeldt i Svendsen, 2007; Sordillo i Aitken, 2009; Celi, 2011; Bassols i sar., 2014; Turk i sar., 2015).

Usled povišenih zahteva laktacije, organizam visokomlečnih krava je veoma često u stanju poremećene homeostaze, pri čemu dolazi do povećanog stvaranja i akumulacije SR koji su prirodni i neizbežni krajnji produkti intenzivnog ćelijskog metabolizma (Valko i sar., 2007). Predisponirajući faktori za nastanak oksidativnog stresa kod mlečnih krava su stanja kao što su visoke vrednosti pri oceni telesne kondicije (*eng.* body score condition - BSC) (Bernabucci i sar., 2005), visoka mlečnost (Lohrke i sar., 2004), hrana koja sadrži lako oksidujuće supstance i toplotni stres. Castillo i sar. (2006) navode da je koncentracija MDA kao jednog od krajnjih produkata LP, najviša tokom rane laktacije kada u organizmu nastaje značajna količina SR.

Uloga oksidativnog stresa u kontroli reprodukcije mlečnih krava nije u potpunosti ispitana. Dokazani su povoljni efekti SR ukoliko su prisutni u niskim koncentracijama, a njihova je značajna uloga u folikulogenezi, steroidogenezi, funkcionisanju žutog tela i luteolizi (Talukder i sar., 2017). Ukoliko postoji povećano stvaranje ROS dolazi do oštećenja membrane žutog tela, inibira se sinteza progesterona, remeti intracelularni transport holesterola i dolazi do preuranjene luteolize (Caput, 1996; Sugino i sar., 2006). Iako embrioni imaju interne (SOD, glutation-peroksidaza) i eksterne (transferin i askorbinska kiselina) mehanizme u zaštiti od prekomernog stvaranja ROS i razvoja oksidativnog stresa, nastanak oksidativnog stresa remeti normalan razvoj embriona, često dovodeći do njegovog uginuća (Agarwal i sar., 2006).

Ispitivanja oksido-redukcionog statusa kod mlečnih krava uglavnom su vezana za tranzicioni period, koji obuhvata period od 3 nedelje pre i 3 nedelje nakon telenja, sa ciljem da se nađe odgovor zašto je ovaj period najkritičniji deo proizvodno-reproduktivnog ciklusa (Bernabucci i sar., 2002; Castillo i sar., 2005; Sordillo i sar., 2007; Kankofer i sar., 2010). Brojna istraživanja oksidativnog statusa visoko mlečnih krava u tranzicionom periodu ukazala su na narušenu ravnotežu između oksidanasa i antioksidanasa, odnosno na pojavu oksidativnog stresa (Turk i sar., 2008; Kankofer i sar., 2010; Sordillo i Aitken, 2009; Esposito i sar., 2014). Nastanak oksidativnog stresa i oštećenja nastala usled oksidativnog stresa tokom tranzicionog perioda potvrđena su povećanjem peroksidacije lipida i smanjenim ukupnim antioksidativnim kapacitetom u tom periodu (Bernabucci i sar., 2002; Castillo i sar., 2005; Abuelo i sar., 2015). Dobro je poznato da se visoko mlečne krave u ovom periodu nalaze u negativnom bilansu energije zbog sve većih energetske potrebe ploda i mlečne žlezde. Fiziološki stres prisutan u ovom periodu povezan je sa promenama sekretornog parenhima, intenzivnim rastom mlečne žlezde i povećanom sintezom mleka, pri čemu se povećavaju zahtevi za energijom i kiseonikom (Gitto i sar., 2002). Intenzivna lipomobilizacija i promene u prometu energije sa ciljem da se zadovolje energetske potrebe ploda i mlečne žlezde do kojih dolazi u relativno kratkom periodu oko telenja predstavljaju značajan izvor oksidanasa i potencijalni okidač za nastanak oksidativnog stresa. U tom periodu, prekomerna lipidna mobilizacija ima ključnu ulogu kao veza između izmenjenog energetskeg metabolizma, oksidativnog stresa i smanjene efikasnosti imunološkog sistema (Sordillo i Mavangira, 2014). U stvari, masno tkivo izlučuje veliki broj supstanci uključenih u modulacije imunološkog odgovora (Sordillo i Aitken, 2009), i tokom prekomerne mobilizacije masnog tkiva, povećava se produkcija proinflamatornih citokina. U toku lipolize, lipaze masnog tkiva započinju proces razgradnje triglicerida do glicerola i neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA) koje se u krvi u najvećem procentu transportuju vezane za albumin. Slobodne masne kiseline su dobar izvor energije, i značajan supstrat za proizvodnju adenzin trifosfata (ATP). Ipak, u slučaju obimne lipomobilizacije, s obzirom da je kapacitet jetre u metabolisanju NEFA ograničen, višak se preusmerava u pravcu sinteze ketonskih tela (aceton, aceto-acetat, β -hidroksi-butirat), što za posledicu ima stanje poznato kao metabolički oksidativni stres (Celi, 2011).

Veća pojava infekcija u tranzicionom periodu može se, takođe, objasniti pojavom oksidativnog stresa. Smatra se da se približno 75% oboljenja mlečnih krava javlja tokom prvog

meseca laktacije (LeBlanc, 2006), i istraživanja su ukazala na povezanost oksidativnog stresa i zaostajanja posteljice kod krava (Miller i sar., 1993; Celi, 2011; Jóźwik i sar., 2012; Boudjellaba i sar., 2018).

Na povezanost ambijentalne temperature i pojavu oksidativnog stresa ukazali su Bernabucci i sar. (2002), koji su u uslovima toplotnog stresa utvrdili više koncentracije indikatora oksidativnog stresa kod mlečnih krava u peripartalnom periodu, a kao model oksidativnog oštećenja boljom se pokazala membrana eritrocita, u poređenju sa krvnom plazmom. Jedan od razloga veće osetljivosti eritrocita na oksidativna oštećenja je povećan parcijalni pritisak kiseonika u krvi, usled ubrzanog i površnog disanja jedinke tokom toplotnog stresa, što za posledicu ima povećano stvaranje SR i slabljenje antioksidativne odbrane eritrocita.

Kod mlečnih krava, takođe, dokazano je učešće oksidativnog stresa u razvoju i komplikaciji nekih patoloških stanja, uključujući i pneumoniju (Herrera i sar., 2009; Lykkesfeldt i Svendsen, 2007). Tokom infekcija respiratornog trakta, neutrofilni granulociti se nagomilavaju u plućnom tkivu kako bi pomogli odbrani od mikroorganizama. Do oštećenja tkiva pluća dolazi ukoliko je odgovor neutrofilnih granulocita preterano jak i dovodi do nagomilavanja brojnih produkata koji štetno deluju na tkivo pluća.

Opisana je i povezanost oksidativnog stresa i mastitisa mlečnih krava (Turk i sar., 2012; Yang i Li, 2015; Sharma i sar., 2016). Izvor ROS u slučaju bakterijske infekcije vimena su pre svega neutrofilni granulociti i aktivirani makrofagi, koji ih u svojim strukturama sintetišu u cilju eliminacije uzročnika mastitisa. Inflamacija kao vitalni zaštitni mehanizam organizma na prisustvo patogenih mikroorganizama (Tizard, 2000) uključuje proizvodnju ROS, fagocitne mehanizme, lučenje baktericidnih supstanci, fibroziranje, neovaskularizaciju i promene tkivne strukture zahvaćenog organa ili telesnog prostora. Strukturne promene tkiva imaju opštu ulogu u fizičkom ograničavanju inflamatornog procesa. Prodor patogenih mikroorganizama kroz sisne kanale mlečne žlezde, povećana infiltracija neutrofila, povećano stvaranje ROS i antibakterijskih peptida značajno dovode do povećanja SCC u mleku, koje su nadalje glavni izvor ROS u borbi protiv bakterija. Iako su veoma značajni u borbi protiv patogenih mikroorganizama, povećana proizvodnja ROS narušava organoleptička svojstva mleka, odnosno direktno narušava kvalitet samog mleka.

Povećano stvaranje ROS u mlečnoj žlezdi je utvrđeno nakon eksperimentalno indukovano akutnog mastitisa inokulacijom lipopolisaharida u vime (Gu i sar., 2009). Blum i

sar. (2000) su dokazali povišene koncentracije nitrita i nitrata u plazmi i u mleku nakon intramamarnе inokulacije bakterija *E. coli* ili endotoksina ove bakterije, ukazujući na postojanje oksidativnog i nitrozativnog stresa kod eksperimentalno izazvanih kliničkih mastitisa.

Detaljnije razumevanje veze između oksido-redukcionog statusa organizma i pojave mastitisa moglo bi dovesti do razvoja efikasnijih strategija u prevenciji ovog oboljenja. Rano otkrivanje mastitisa je važno jer se na taj način ranije započne lečenje, čime se smanjuje oštećenje vimena i ublažava se pad proizvodnje mleka. Ispitivanje parametara oksidativnog statusa krava sa mastitisom može doprineti boljem poznavanju patofiziologije mastitisa i ranom otkrivanju bolesti kako bi se blagovremeno započela terapija i smanjili ekonomski gubitci. Iako je i dalje diskutabilno da li je oksidativni stres uzrok specifičnih oboljenja ili je epifenomen razvoja bolesti, nastanak prooksidanasa je jedan od najočitijih posledica inflamacije (Gabai i sar., 2019). Nastanak ROS obično je u početku samo lokalno, na mestu oštećenja ili infekcije tkiva, ali ukoliko inflamatorni odgovor nije pod kontrolom, stanje oksidativnog stresa prelazi u hronični oblik, dovodeći do sistemskih promena u organizmu (Gabai i sar., 2019). Prisustvo patogenih mikroorganizama u mlečnoj žlezdi dodatno povećava stvaranje slobodnih radikala, povećava se potrošnja ukupnog antioksidativnog sistema, i tokom ove odbrambene reakcije može doći i do oksidativne modifikacije različitih biomolekula i oštećenja lokalnog tkiva, kao neka vrsta "kolateralne štete" što dovodi do intenziviranja zapaljenja i oštećenja ćelija i tkiva vimena.

Iako se poslednjih godina povećao interes za ispitivanje oksidativnog stresa kod mlečnih krava, i dalje postoji povećana potreba za daljim istraživanjima. I dalje ostaje nejasno da li je oksidativni stres primarni uzrok pojedinih patoloških stanja ili posledica napredovanja i pogoršanja oboljenja. Jasno razumevanje patofiziologije oksidativnog stresa kod mlečnih krava omogućilo bi primenu određenih antioksidanasa u terapiji određenog oboljenja. Dalja istraživanja bi trebalo usmeriti na određivanje pojedinih indikatora oksidativnog stresa kao biomarkera, ali i na standardizaciju tehnika i metoda za njihovo određivanje u svim laboratorijama.

3.0. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Cilj doktorske disertacije je bio da se ispita oksidativni status krava sa supkliničkim mastitisima izazvanim sa *S. aureus* preko parametara antioksidativne zaštite i oksidativnog stresa, kao i da se utvrdi povezanost datih parametara sa lipidnim statusom jedinke. Takođe, cilj je da se ispita mogućnost upotrebe nekog od markera u dijagnostici i praćenju supkliničkih mastitisa.

Da bi se ostvarili navedeni ciljevi, postavljeni su sledeći zadaci:

- Izolacija i identifikacija *S. aureus* iz uzoraka mleka sa povećanim SCC
- Određivanje lipidnog statusa jedinki (određivanje ukupnog holesterola, HDL, LDL i triglicerida).
- Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima: superoksid-dizmutaze, katalaze, paraoksonaze, arilesteraze, mijeloperoksidaze i laktoperoksidaze.
- Određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta (preko DPPH i ABST testa).
- Određivanje oštećenja ćelijske membrane (preko koncentracije MDA, koncentracije LOOH i osmotske fragilnosti eritrocita).
- Određivanje parametara reaktivnih azotovih vrsta (koncentracija nitrita).
- Određivanje broja tiolnih grupa i uznapredovalih proizvoda oksidacije proteina.
- Praćenje reaktivnih kiseoničnih vrsta (preko koncentracije vodonik-peroksida).

4. MATERIJAL I METODE

4.1. DIZAJN EKSPERIMENTA

Istraživanje je sprovedeno na komercijalnoj farmi sa približno 1200 mlečnih krava, starosti 2-5 godina, koje su držane u istim ambijentalnim uslovima. Kod svih krava za ocenu BSC korištena je skala Edmondson i sar. (1989) (1 - veoma mršave, 3 - normalne, 5 - debele krave). Kako bi se izbegao uticaj tranzicionog perioda na ispitivane parametre, uzorci krvi i mleka su uzimani od 32 do 102 dana nakon telenja. Krave kod kojih su uočeni znakovi kliničkog mastitisa, ili nekog drugog oboljenja su isključene iz ogleada. Svi uzorci pozitivni na KMT su u roku od 2h dopremani u laboratoriju gde je dodatno izvršeno mikroskopsko određivanje SCC i mikrobiološka izolacija i identifikacija uzročnika. Uzorci negativni na *S. aureus*, kontaminirani uzorci (kod kojih je izolovano više od tri različita mikroorganizma), kao i uzorci kod kojih je izolovan neki drugi mikroorganizam su isključeni iz ogleada.

U oglead su bile uključene 104 mlečne krave. Kod 92 krave (135 uzoraka mleka) *S. aureus* je izolovan. Na osnovu broja kolonija (*eng.* colony forming unit - CFU) *S. aureus* po mililitru mleka krave sa SCM izazvanim sa *S. aureus* su podeljene dalje na dve grupe SCM₁ (< 1000 CFU/mL, n = 37 krava, 68 uzoraka mleka iz pojedinih četvrti vimena) i SCM₂ (≥ 1000 CFU/mL, n = 55, 67 uzoraka mleka iz pojedinih četvrti vimena). Obe grupe su imale približne vrednosti SCC određivan mikroskopski. Kontrolnu grupu (CON) krava činile su zdrave krave koje su bile KMT i mikrobiološki negativne (n = 12, 48 uzoraka mleka iz četvrti vimena).

Nije postojala značajna razlika u starosti, BSC i danima nakon telenja između ispitivanih grupa krava.

4.2. UZORKOVANJE BIOLOŠKOG MATERIJALA

Uzorci krvi sakupljani su iz *vena coccygea* u vakutajnere bez antikoagulansa za izdvajanje seruma, i u vakuntajnere sa litijum-heparinom kao antikoagulansom za odvajanje plazme i eritrocita.

Plazma je izdvojena nakon centrifugiranja 10 mL krvi sa antikoagulansom, na 3000 rpm u trajanju od 10 minuta. Nakon odvajanja leukocita i trombocita, eritrociti su ispirani tri puta fiziološkim rastvorom, a svako ispiranje je praćeno centrifugiranjem u trajanju od 10 minuta.

Serum je izdvojen na sobnoj nakon stajanja od 2h, i centrifugiranja na 3000 rpm u trajanju od 15 min.

Uzorkovanje mleka je izvršeno nakon čišćenja vimena i dezinfekcije pomoću gaza natopljenih u 70% alkohol. Prvi mlazevi mleka su odbacivani, nakon čega su uzorci sakupljeni u sterilne epruvete od 10 mL. Mlečni serum je izdvojen dodavanjem 0,5 mL rastvora sirćetne kiseline u 9,5 mL mleka, i inkubiranja na 42 °C, 10 minuta. Nakon hlađenja i centrifugiranja na 750 rpm u trajanju od 15 minuta, 1 mL supernatanta je odliven u plastične test epruvete od 1,5 mL (Ependorf tubice).

Krvna plazma, eritrociti, krvni i mlečni serum su zamrzavani na – 20 °C i čuvani do analize.

4.3. METODE ISPITIVANJA

4.3.1. Određivanje broja somatskih ćelija u mleku (SCC)

Ispitivanje SCC u uzorcima mleka izvršeno je svetlosnom mikroskopijom, primenom referentne metode prema SRPS EN ISO 13366-1:2010. U Evropi, Regulativom. 853/2004, a u Republici Srbiji Pravilnikom o veterinarsko-sanitarnim uslovima, odnosno opštim i posebnim uslovima higijene hrane životinjskog porekla, kao i uslovima higijene hrane životinjskog porekla (Sl. glasnik br. 25/2011 i 27/2014) propisano je da mleko sa preko 400 000 SCC/mL ne može biti upotrebljeno u ishrani ljudi.

4.3.2. Mikrobiološka ispitivanja mleka

Izolacija *S.aureus* izvršena je standardnim mikrobiološkim metodama. Svi uzorci su zasejavani na mikrobiološke podloge istog dana kada su uzorkovani. Uzorci mleka su pažljivo promućkani i 0,01 mL mleka je zasejan na krvni agar (LabM, Velika Britanija) sa dodatkom 7% ovčije krvi i Baird-Parker agar (LabM, Velika Britanija).

Ploče su inkubirane aerobno 24-48 h na 37 °C, nakon čega je na krvnom agaru proveravano prisustvo α-hemolize i β-hemolize. Sposobnost sinteze katalaze određena je pomoću 3% H₂O₂, dok je za određivanje sposobnosti sinteze koagulaze stafilokoka korištena liofilizovana plazma kunića (Abtek, Liverool, UK).

Kao test za potvrdu u postupku identifikacije bakterija iz roda *Staphylococcus* primenjivani su komercijalni biohemijski testovi Microgen Staph ID System (Camberley, UK). Konačna identifikacija izvršena je pomoću kompjuterskog programa nakon unosa rezultata.

Broj kolonija *S. aureus* je određivan posle razblaženja mleka, i zasejavanja 0,1 mL od svakog razblaženja na površinu selektivnog Baird-Parker agara (LabM, Velika Britanija).

4.3.3. Određivanje lipidnog statusa

Određivanje lipidnog statusa: ukupnog holesterola (*eng.* total cholesterol - TC), HDL, LDL i triglicerida (TG) u krvnom serumu, izvršeno je upotrebom komercijalnih kitova (Biosistem, Barselona, Španija) prema uputstvima proizvođača. Serumski HDL određivan je enzimskom metodom nakon selektivne precipitacije VLDL i LDL upotrebom smeše fosfovolframove kiseline i jona magnezijuma. Koncentracija TG je određivana enzimskom metodom pomoću glicerolfosfat-oksidade. Koncentracija TC je određivana enzimskom metodom pomoću holesterol-oksidade u čijem prisustvu se holesterol oksiduje i izdvaja H₂O₂. Oslobođeni H₂O₂ reaguje sa fenolom i 4-aminoantipirinom u prisustvu peroksidaze pri čemu nastaje obojeni kompleks. Koncentracije TG i LDL su takođe određivane enzimskim metodama. Sva merenja su izvršena spektrofotometrijski na automatskom biohemijskom aparatu BioSystems A15 (Barselona, Španija).

4.3.4. Određivanje parametara oksidativnog stresa u uzorcima krvi i mleka

4.3.4.1. Određivanje koncentracije vodonik-peroksida (H_2O_2)

Stvaranje H_2O_2 u uzorcima krvnog i mlečnog seruma, praćeno je spektrofotometrijski, prema metodi koju su opisali Pick i Keisari (1980). Test se zasniva na oksidaciji fenol-crvenog sa H_2O_2 u prisustvu peroksidaze iz rena (*eng.* Horse Radish Peroxidase - HRPO), što rezultira povećanjem apsorbance na 610 nm. U 0,8 mL fosfatnog pufera pH 7,0 koji je sadržavao 140 mM NaCl, 5,5 mM glukozu i 0,28 mM fenil-crveno dodato je 0,2 mL uzorka. Nakon dodavanja 10 μ L peroksidaze (8,5 U/mL), smeša je inkubirana na 25 °C, 10 minuta. Reakcija je zaustavljena sa 10 μ L 1 M NaOH, nakon čega je merena promena apsorbance na 610 nm. Koncentracija H_2O_2 izračunata je iz standardne krive ($y = 2,78498 + 0,36837x$, $r = 0,9993$). Vrednosti su izražene u μ mol/L.

4.3.4.2. Određivanje aktivnosti superoksid- dismutaze (SOD)

Aktivnost SOD određena je spektrofotometrijski, upotrebom komercijalnog Randox kita i Ransond standarda (Manual/Rx monza sd 125, Randox Laboratories Limited, Crumlin, Country Antrim, United Kingdom), prema uputstvima proizvođača. U prisustvu supstrata, ksantin i ksantin-oksidaza katalizuju nastanak superoksid radikala, pri čemu nastaje crvena formazan boja. Aktivnost SOD je određivana kao stepen inhibicije ove reakcije. Promena apsorbance je praćena na 505 nm u trajanju od 3 minuta. Vrednosti su izražavane u U/gHb u eritrocitima i U/mL u mlečnom serumu.

4.3.4.3. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Aktivnost CAT određena je spektrofotometrijski, po metodi Aebi (1984), na talasnoj dužini 240 nm, karakterističnoj za apsorpcioni maksimum H_2O_2 , pri čemu stepen smanjenja apsorbance odgovara količini razgrađenog H_2O_2 od strane CAT. U kvarenu kivetu, ukupne zapremine 1 mL, dodat je 10 mM H_2O_2 i uzorci hemolizata eritocita krava ili mlečni serum.

Promena apsorbance praćena je tokom 3 minuta. Vrednosti su izražavane u U/g hemoglobin (U/g Hb) što odgovara μmol razgrađenog H_2O_2 po minuti po gramu hemoglobin u eritrocitima, i U/mL u mlećnom serumu.

4.3.4.4. *Određivanje PON1-arilesterazne aktivnosti (PON1-ARE)*

Arilesterazna aktivnost PON1 određivana je spektrofotometrijski, prema metodi Gan i sar. (1991). Aktivnost ovog enzima je merena u reakcionoj smeši (3 mL) koja je sadržavala 1 mM fenil-acetat i 2 mM CaCl_2 u 20 mM Tris-HCl puferu pH 8,0. Nakon dodavanja 10 μL krvnog ili mlećnog seruma, praćeno je povećanje apsorbance na 270 nm, 3 minuta na 37 °C. Za preraćunavanje stepena hidrolize korišten je apsorpcioni koeficijent koji iznosi $1,310 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Slepa proba bez uzorka korištena je radi korekcije spontane hidrolize fenil-acetata. Aktivnost enzima je izražena u U/mL ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$) u krvnom serumu, ili u mU/mL ($\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}$) u mlećnom serumu (1U hidrolizuje 1 μmol fenil-acetata u minuti).

4.3.4.5. *Određivanje PON1-paraoksonazne aktivnosti (PON1)*

Paraoksonazna aktivnost PON1 je merena prema modifikovanoj metodi Alapati i Mihasi (1999). Reakciona smeša (1 mL) sadržavala je 200 μL sintetskog paraoksiona (dietyl-p-nitrofenil fosfat) kao supstrata, 50 μL CaCl_2 , 400 μL NaCl u 1 mM Tris-HCl puferu pH 8,5. Nakon dodavanja uzorka krvnog seruma, spektrofotometrijski je praćeno povećanje apsorbance na 412 nm, 5 minuta na 37 °C. Apsorpcioni koeficijent korišten za preraćunavanje stepena hidrolize je $18,500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Aktivnost enzima je izražena u U/mL

4.3.4.6. *Određivanje aktivnosti mijeloperoksidaza (MPO)*

Aktivnost MPO u krvnom i mlećnom serumu je određivana spektrofotometrijski na 460 nm, prema metodi Bradley i sar. (1982), praćenjem koncentracije oksidovanih formi o-diazidina u reakciji sa H_2O_2 . Vrednosti su izražene u U/mL.

4.3.4.7. Određivanje aktivnosti laktoperoksidaza (LPO)

Aktivnost LPO u krvnom i mlečnom serumu određivana je modifikovanom metodom po Barrett i sar. (1999). Rastvor je sadržavao 0,1 mM fosfatni pufer, pH 6,0 sa 0,6 mM ABTS i 0,1 mM H₂O₂. Enzimaska reakcija je započeta dodavanjem 0,6 mL sveže pripremljenog 0,1 mM H₂O₂. Absorbanca je praćena spektrofotometrijski na 412 nm u toku jednog minuta. Jedna enzimaska jedinica (U) se definiše kao aktivnost oksidacije jednog 1 µmol supstrata (ABTS) u prisustvu LPO. Aktivnost enzima je izražena u U/mL.

4.3.4.8. Određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta (TAC)

U radu su za određivanje TAC u krvnom i mlečnom serumu, korištene dve metode: određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) radikala i određivanje sposobnosti neutralizacije ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline)) radikala. Obe metode ukazuju na sposobnost neutralizacije SR, i mehanizmi delovanja su im slični.

4.3.4.8.1. Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala

Određivanje TAC je rađeno spektrofotometrijski merenjem redukcije DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazila) prema metodi koju su opisali Thapoining i sar. (2006). DPPH radikal se odlikuje ljubičastom bojom sa maksimumom apsorpcije na 515 nm. Kada se rastvor DPPH radikala doda ispitivanom uzorku, reakcija redukcije se vrši srazmerno prisustvu antioksidanasa u uzorku, i boja se menja od ljubičaste ka žutoj, što se očitava opadanjem apsorbance.

Za reakciju se uvek priprema svež rastvor DPPH. Dobijeni rastvor se meša na vorteksu i drži u mraku do merenja. Radni rastvor sadrži 1,450 mL razblaženog rastvora DPPH i određenu zapreminu ispitivanog uzorka. Pripremljeni rastvori se mešaju na vorteksu i stavljaju u mrak 1 sat, nakon čega se očitava apsorbance na 515 nm. Evaluacija antioksidativne aktivnosti izvršena je konstruisanjem kalibracione krive i izražavanjem rezultata kao procenta inhibicije, izračunatih iz formule:

$$\% \text{ inhibicije}_{515\text{nm}} = ((\text{kontrola Abs}_{515\text{nm}} - \text{uzorak Abs}_{515\text{nm}}) / \text{kontrola Abs}_{515\text{nm}}) \times 100$$

Kao standard korišten je Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), hidrosolubilni ekvivalent vitamina E). Pomoću kalibracione krive ($y = 2,78498 + 0.36837 x$, $r = 0,9993$) preračunate su vrednosti, i izražene u ekvivalentima Troloksa.

4.3.4.8.2. *Određivanje sposobnosti neutralizacije ABTS radikala*

ABTS test je realizovan spektrofotometrijski, prema modifikovanoj metodi Re i sar. (1999). Ova metoda se zasniva na sposobnosti antioksidativnih bioaktivnih jedinjenja da hvataju katjon radikala 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS⁺) i redukuju ovu radikalsku formu plavo-zelene boje u bezbojnu neutralnu formu. Smanjenje apsorbance, odnosno intenzitet obezbojavanja rastvora srazmeran je koncentraciji prisutnih ukupnih antioksidanasa u uzorku. Rastvor ABTS⁺ dobijen je reakcijom ABTS rastvora sa kalijum-persulfatom i čuvan je u mraku. Promena apsorbance očitavana je na 734 nm. Procenat inhibicije izračunat je iz sledeće jednačine:

$$\% \text{ inhibicije}_{734\text{nm}} = ((\text{kontrola Abs}_{734\text{nm}} - \text{uzorak Abs}_{734\text{nm}}) / \text{kontrola Abs}_{734\text{nm}}) \times 100$$

Pomoću kalibracione krive ($y = 0,12187 + 69,95419x$, $r = 0,9978$) preračunate su vrednosti i izražene u ekvivalentima Troloksa.

4.3.5. **Određivanje parametara oksidativnog oštećenja ćelije**

4.3.5.1. *Određivanje koncentracije malondialdehida (MDA)*

Malondialdehid je krajnji proizvod oksidacije nezasićenih masnih kiselina i odražava nivo LP. Step en oštećenja ćelijske membrane eritrocita određivan je spektrofotometrijski preko koncentracije MDA, prema metodi Gutteridge (1995) i Traverso i sar. (2004), merenjem intenziteta obojenog kompleksa, koji se formira u reakciji tiobarbiturne kiseline (*eng.* thiobarbituric acid, TBA) sa MDA. Hemolizatu eritrocita dodata je 0,1 M trihlorsirćetna kiselina.

Nakon centrifugiranja na 3 000 rpm u trajanju od 10 minuta, odvojen je supernatant u koji je zatim dodata 1% TBA u 0,05 M NaOH. Smeša je zatim zagrevana u vodenom kupatilu na 100 °C, 1 h. Nakon hlađenja TBA-MDA kompleks je ekstrahovan dodavanjem *n*-butanola. Apsorpcija je merena spektrofotometrijski na 535 nm. Vrednosti su izračunate pomoću apsorpcionog koeficijenta, 1,56 M⁻¹cm⁻¹. Koncentracija MDA je izražena u nanomolima po gramu hemoglobina (nmol/gHb).

Određivanje koncentracije MDA u mleku izvršeno je modifikovanom metodom opisanom po Gutteridge (1995) i Traverso (2004), bez dodavanja *n*-butanola, direktnim merenjem absorbance na 535 nm. Vrednosti su izražene u MDA nmol/mL mleka.

4.3.5.1.1. Određivanje koncentracije hemoglobina

U hemolizatima eritrocita koncentracija hemoglobina je određivana pomoću metode sa cijanmethemoglobinskim reagensom (Tentori i Salvati, 1981). Metoda se zasniva na oksidaciji hemoglobina kalijum-fericijanatom (K₃[Fe(CN)₆], koji dalje u reakciji sa kalijum-cijanidom (KCN) daje stabilan crveni kompleks (cijanmethemoglobin) čiji se intenzitet meri spektrofotometrijski na 540 nm.

4.3.5.2. Određivanje koncentracije lipidnih-hidroperoksida (LOOH)

Određivanje koncentracije LOOH u krvnoj plazmi i mlečnom serumu, izvršeno je spektrofotometrijski, prema metodi Zadeh (1999) i Gay i sar. (1999), upotrebom gvožđe(III)-ksilenol oranž (*eng.* ferric-xyleneol orange - FOX) reagensa koji je sadržavao 90% metanol, 25 mM H₂SO₄, 250 μM gvožđe (II) sulfat heptahidrata i 100 μM ksilenol-oranža. Metoda se zasniva na redukciji peroksida u kiseloj sredini pomoću Fe²⁺ i stvaranju obojenog gvožđe(III)-ksilenol-oranž (XO/Fe³⁺), sa maksimumom apsorpcije na 560 nm. Koncentracija LOOH je izračunata preko apsorpcionog koeficijenta 3,0 x 10⁴ M⁻¹cm⁻¹. Vrednosti su izražene u μmol/L.

4.3.5.3. *Određivanje koncentracije nitrita (NO_2^-)*

Koncentracija NO_2^- u krvnoj plazmi i mlečnom serumu, određivana je u reakciji sa Griess-ovim reagensom (0,346 M sulfanilne kiseline i 2,1 mM N-(naftil)-etilenediamin dihidrohlorida), po metodi Guevara i sar. (1998). Nakon precipitacije sa cink-sulfatom (ZnSO_4) i centrifugiranja na 10 000 rpm u trajanju od 10 minuta, 50 μL supernatanta je dodavano u bunarčice ELISA ploče. Griess-ov reagens u reakciji sa nitritima daje ljubičasto jedinjenje sa azo-grupom. Koncentracija NO_2^- određena je merenjem apsorbance azo-jedinjena na 540 nm, pomoću ELISA čitača (Plate reader, Nubenco Enterprises, INC). Upotrebom natrijum-nitrata (NaNO_2) kao standarda konstruisana je kalibraciona kriva ($y = -0,00487 + 0,00167x$, $r = 0,9994$) pomoću koje su preračunate koncentracije nitrita u uzorcima. Sva merenja su rađena u triplikatu u mikrotitarskim pločama sa 96 bunarčica. Koncentracija NO_2^- su izražene u $\mu\text{mol/L}$.

4.3.5.4. *Određivanje koncentracije uznapredovalih proizvoda oksidacije proteina (AOPP)*

Koncentracija AOPP u uzorcima krvne plazme i mlečnog seruma, određivana je spektrofotometrijski, tako što je u smešu koju čine sirćetna kiselina (CH_3COOH) i fosfatni pufer u odnosu 1 : 9 i kalijum-jodid (KI) dodat uzorak. Apsorbanca je očitavana nakon 1 minuta na 340 nm. Koncentracija AOPP izračunata je iz standardne krive za hloramin-T ($y = 0,004076 + 0,01867x$, $r = 0,9994$). i izražena u $\mu\text{mol/L}$ hloramin-T ekvivalenta.

4.3.5.5. *Određivanje koncentracije tiolnih (SH-) grupa*

Za određivanje koncentracije SH-grupa korištena je spektrofotometrijska metoda po Ellman-u (1959). Metoda se zasniva na reakciji 2,2-dinitro-5,5-ditio-benzoeve kiseline (DTNB) sa SH-grupama, pri čemu se stvara mol anjona p-nitrofenola po molu tiola. Pri reakciji DTNB sa SH-grupama proteina u blago baznoj sredini (pH 7 - 8) nastaje žuta boja sa maksimumom apsorpcije na 412 nm. Reakcionu smešu čini uzorak, pufer i Ellman-ov reagens. Nakon inkubacije u mraku u trajanju od 10 minuta, apsorbanca je očitana na 412 nm. Koncentracija SH-

grupa u uzorku je izračunata preko molarnog apsorpcionog koeficijenta *p*-nitrofenola ($14,150 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) i izražena u $\mu\text{mol/L}$.

4.3.5.6. Određivanje aktivnosti enzima laktat-dehidrogenaze (LDH)

Aktivnost enzima LDH u krvnom i mlrčnom serumu, određivana je spektrofotometrijski, po metodi Bergmeyer i Brent (1974). Reaktivnu smešu (2,0 mL) činili su Tris-HCl (61,43 mM, pH 7,4) i NADH (0,18 mM) sa dodatkom piruvata (0,6 mM). Nakon dodavanja 100 μL uzorka smanjenje apsorbance praćeno je na 339 nm, 3 minuta na 37 °C. Molarni apsorpcioni koeficijent korišten za preračunavanje stepena hidrolize je $6,220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Aktivnost enzima izražena je u U/L.

4.3.5.7. Određivanje relativne aktivnosti izoenzimskih oblika LDH

Laktat-dehidrogenaza postoji u pet izoenzimskih oblika (LDH1, LDH2, LDH3, LDH4 i LDH5) sa različitom distribucijom u pojedinim organima. Distribucija izoenzima je tkivno specifična i dijagnostički analiziranje izoenzima veoma značajno za procenu stepena i vrste oštećenog tkiva. Poznato je da se izoenzimi razlikuju po katalitičkim i fizičkim osobinama, i za razdvajanje izoenzima najčešće se koristi elektroforeza. Izoenzimski oblici LDH su određivani po metodi Yoshida i Takakuwa (1997). Za određivanje izoenzima korištena je vertikalna poliakrilamid gel elektroforeza (PAGE) na 7,5% gelu uz primenu Tris-glicinskog pufera (Hoeffler Mini Ve, Upsala, Švedska). Nakon razdvajanja izoenzima gel je inkubiran sa reakcionom smešom Na-laktata i nitrotetrazolijumskog plavog (NBT). Intenzitet traka je meren korišćenjem kompjuterskog paketa za Windows Total Lab TL 120. Rezultati su izraženi u procentima, odnosno udelu određenog izoenzima u odnosu na ukupnu aktivnost LDH.

4.3.5.8. Određivanje osmotske fragilnosti eritrocita

Osmotska fragilnost eritrocita ispitivana je u svežim eritrocitima, u prisustvu različitih koncentracija NaCl, spektrofotometrijski na 540 nm, prema metodi po Beutler i sar. (1982). Po

10 μ L ispranih eritrocita se dodaje u 5 mL rastvora NaCl različitih koncentracija. Princip testa je zasnovan na činjenici da u hipotoničnom rastvoru NaCl resuspendovani eritrociti usled ulaska vode bubre, postaju sferični i na kraju pucaju. Stepen hemolize svakog uzorka izražen je kao procenat apsorpcije hemoglobina u odnosu na maksimalnu apsorpciju vodenog rastvora hemolizata eritrocita. Kriva kumulativne osmotske fragilnosti eritrocita iscertana je na osnovu stepena hemolize uzoraka u serijskim razblaženjima NaCl, pomoću programa Origin 6.0 38 Professional.

Sva spektrofotometrijska merenja izvršena su na CECIL CE 2021 UV/VIS spektrofotometru.

4.4. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka izvršena je pomoću GraphPad Prism 6.00 statističkog softvera (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Normalna distribucija je testirana D'Agostino-Pearson omnibus statističkim testom. Statistička značajnost razlika ispitivanih vrednosti (P) utvrđena je upotrebom ANOVA testa, Tukey-ovim testom. Kao statistički značajne uzete su razlike na nivou $P < 0,05$. Ukoliko distribucija nije pratila raspodelu Gaussian, primenjivan je Kruskal-Wallis test. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardna greška (SE) za normalnu raspodelu i kao interkvartilne vrednosti ukoliko vrednosti nisu pratile normalnu distribuciju. Stepen povezanosti ispitivanih parametara utvrđivan je Pearson-ovim i Spearman-ovim koeficijentom korelacije (r) i proverom statističke značajnosti koeficijenta korelacije ($P < 0,05$). Jačina korelacije je definisana prema Evans (1996). H_{50} je utvrđen Sigmoidalnim (Boltzman-ovim) testom korišćenjem Origin 9.0 Professional programa.

Rezultati analize ispitivanih parametara prikazani su tabelarno i grafički.

5. REZULTATI

5.1. Opšte karakteristike ispitivanih krava

Opšte karakteristike zdravih krava i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim sa *S. aureus* (SCM) prikazane su u tabeli 3. Ispitivanje je sprovedeno na 104 krave: kontrolna grupa - CON (KMT i mikrobiološki negativna, n = 12 krava, 48 uzoraka mleka iz četvrti vimena), supklinički mastitis (SCM₁) grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka, n = 37 krava, 68 uzoraka mleka iz pojedinih četvrti vimena) i supklinički mastitis (SCM₂) grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka, n = 55 krava, 67 uzoraka mleka iz pojedinih četvrti vimena). Između ispitivanih grupa krava nisu uočene značajne razlike u starosti, BSC i danima nakon telenja.

Značajno povećanje broja somatskih ćelija ($P < 0,001$) utvrđeno je u mleku krava sa supkliničkim mastitisom (SCM₁ i SCM₂) u poređenju sa zdravim, kontrolnim kravama.

Tabela 3. Opšte karakteristike kontrolne grupe krava (CON) i grupa krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim sa *S. aureus* (SCM₁ i SCM₂).

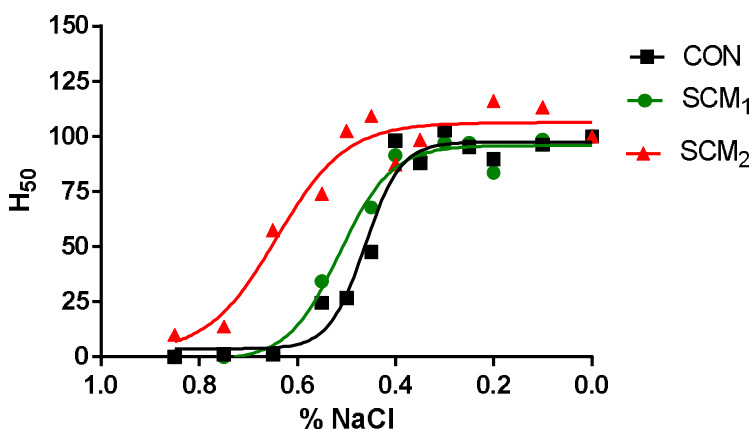
	CON (n = 12)	Supklinički mastitis izazvan sa <i>S. aureus</i>	
		SCM ₁ (n = 37)	SCM ₂ (n = 55)
Starost (godine)	3 (2 - 4)	3,5 (2 - 5)	3,5 (2 - 5)
Broj dana nakon telenja	64 (32 - 96)	70 (38 - 102)	65,5 (34 - 97)
BSC	2,5 - 3,5	2,5 - 3,5	2,5 - 3,5
SCC x10 ⁶ ćelija/mL mleka	0,09 (0,01 - 0,39)	1,46 (0,51 - 6,05) ***	1,67 (0,65 - 7,84) ***
CFU/mL <i>S.aureus</i>	0	< 1 000	≥ 1000
Broj četvrti vimena	48	148	220
Broj inficirani četvrti vimena	0	68	67

5.2. Mikrobiološka ispitivanja mleka

Kolonije svih ispitivanih uzoraka bile su na krvnom agaru krem ili žućkasto-zlatne boje, ispupčene, sjajne i glatke. Kod svih izolata uočena je dvostruka hemoliza na krvnom agaru nakon inkubacije 24 h na 37 °C pod aerobnim uslovima. Svi izolati bili su pozitivni bojenjem po Gramu, u grozdastim nakupinama na obojenom preparatu. Takođe, svi su bili katalaza pozitivni, oksidaza negativni i koagulaza pozitivni. MicrogenID Staph sistemom svi izolati su identifikovani kao *S. aureus*.

5.3. Ispitivanje osmotske fragilnosti eritrocita

Rezultati analize osmotske fragilnosti eritrocita kod kontrolne grupe krava i grupa krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim sa *S. aureus* (SCM₁ i SCM₂) prikazani su na grafikonu 1.



Grafikon 1. Osmotska fragilnost eritrocita. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SE. Kontrolna grupa krava (CON), krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (\geq 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

Stepen hemolize (H₅₀) eritrocita kontrolne grupe iznosio je $0,4619 \pm 0,0042$. Povećanje H₅₀ od 11,26% je zabeleženo u SCM₁ ($0,5139 \pm 0,0054$), dok je povećanje H₅₀ od 39,01% zabeleženo u SCM₂ grupi ($0,6421 \pm 0,0047$), u poređenju sa H₅₀ kod kontrolne grupe krava ($P <$

0,01). Eritrocitna membrane krava SCM₂ pokazala je najnižu osmotsku stabilnost izazvanu različitim koncentracijama NaCl.

5.4. Analiza lipidnog statusa

Rezultati dobijeni analizom lipidnog statusa u uzorcima krvnog seruma su prikazani u tabeli 4. Analizom rezultata koncentracije ukupnog holesterola nije utvrđena statistički značajna razlika između grupa sa supkliničkim mastitisom (SCM₁ i SCM₂) i kontrolne grupe krava. Značajno niže koncentracije HDL uočene su SCM₂ grupi u poređenju sa koncentracijama kod zdravih kontrolnih krava ($P < 0,01$). Poređenjem rezultata koncentracije HDL između grupa krava sa SCM značajno niže vrednosti su utvrđene u SCM₂ grupi u odnosu na SCM₁ grupu ($P < 0,01$). Dobijeni rezultati su ukazali i na značajno povišenu koncentraciju LDL u grupama krava sa supkliničkim mastitisom, od 95,45% u SCM₁ grupi ($P < 0,05$), i za 2,36 puta u SCM₂ grupi ($P < 0,01$) u odnosu na koncentracije LDL kod kontrolne grupe. Poređenjem koncentracija triglicerida između grupa krava sa supkliničkim mastitisom i kontrolne grupe krava nije utvrđena statistički značajna razlika.

Tabela 4. Srednje vrednosti koncentracije serumskih lipida sa interkvartalnim vrednostima (TC, HDL, LDL i TG)

Parametri (mmol/L)	CON	Supklinički mastitis	
		SCM ₁	SCM ₂
TC	3,06 (2,29 – 3,84)	3,07 (1,70 – 4,90) ^{ns}	2,47 (1,41 – 5,38) ^{ns}
HDL	2,00 (1,79 – 2,87)	1,97 (0,65 – 2,89) ^{ns}	1,60 (0,22 – 2,87) ^{*,##}
LDL	0,22 (0,09 – 0,38)	0,43 (0,14 – 1,11) [*]	0,52 (0,11 – 1,64) ^{**}
TG	0,35 (0,12 – 0,52)	0,18 (0,04 – 0,51) ^{ns}	0,17 (0,03 – 0,41) ^{ns}

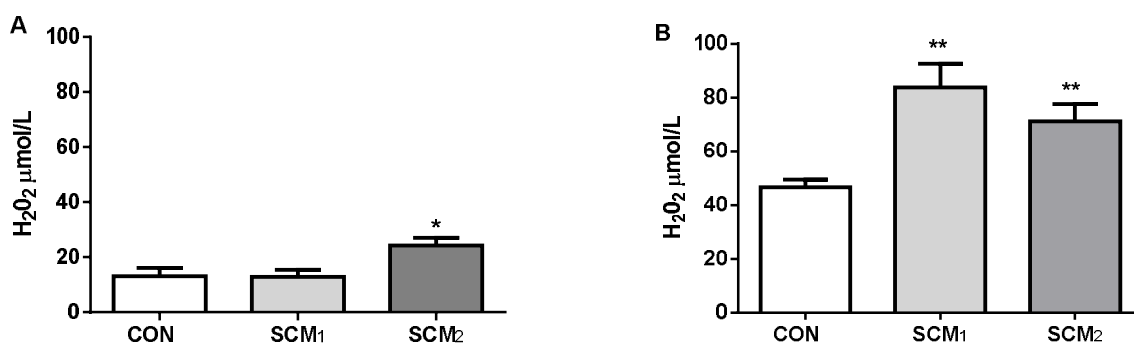
CON - kontrolna grupa krava, SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$: značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom, ## $P < 0,01$: značajna razlika u poređenju SCM₁ sa SCM₂ grupom; ns – bez statističke značajnosti.

5.5. Analiza parametara oksidativnog stresa

5.5.1. Analiza stvaranja ROS preko koncentracije vodonik-peroksida

Rezultati merenja koncentracije H_2O_2 u krvnom i mlečnom serumu kod kontrolne grupe krava i grupa krava sa SCM prikazani su na grafikonu 2 i u tabelama 5 i 6.



Grafikon 2. Koncentracije H_2O_2 (srednja vrednost \pm SE) u krvnom serumu (A) i mlečnom serumu (B), CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (\geq 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**): značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom.

Dobijeni rezultati su ukazali da je infekcija vimena krava bakterijom *S. aureus* dovela do povećanja koncentracije H_2O_2 u krvnom serumu krava SCM₂ grupe od 83,13% u poređenju sa kontrolnom grupom ($P < 0,05$). Poređenjem koncentracije H_2O_2 u krvnom serumu SCM₁ grupe u odnosu na kontrolnu grupu nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji ovog reaktivnog molekula.

Analizom koncentracije H_2O_2 u mlečnom serumu krava sa supkliničkim mastitisom i kontrolne grupe krava uočeno je značajno povećanje koncentracije H_2O_2 od 79,19% u SCM₁ grupi, i od 52,41% u SCM₂ grupi, što je na nivou statističke značajnosti $P < 0,01$.

Tabela 5. Deskriptivni statistički parametri koncentracije H₂O₂ u krvnom serumu kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} (mmol/L)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	13,22	7,62	2,88	3,72	15,48	20,58	2,04	21,23	6,182	20,27
SCM ₁	12,87	15,98	2,56	2,93	4,76	17,71	0,32	76,00	7,691	18,05
SCM ₂	24,21	19,22	3,00	7,90	23,45	30,38	2,36	97,57	18,14	30,28

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

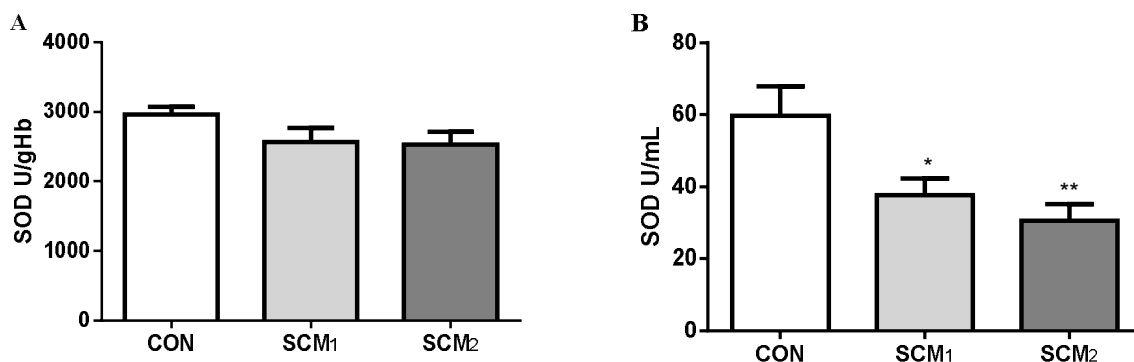
Tabela 6. Deskriptivni statistički parametri koncentracije H₂O₂ u mlečnom serumu kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} (mmol/L)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	46,67	17,48	2,70	33,26	42,80	59,89	13,65	86,20	41,23	52,12
SCM ₁	83,77	65,83	8,80	36,36	54,70	119,7	22,80	276,40	66,14	101,4
SCM ₂	71,13	48,85	6,31	37,51	64,57	89,47	23,85	290,80	58,51	83,75

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

5.5.2. Analiza aktivnosti enzima superoksid-dismutaze

Prvu liniju odbrane od ROS predstavlja enzim SOD koja prevodi visoko reaktivni superoksidni anjon radikal do H₂O₂ i molekularnog kiseonika. Rezultati aktivnosti SOD su prikazani na grafikonu 3 i u tabelama 7 i 8. Analizom aktivnosti SOD u eritrocitima grupa krava sa SCM i kontrolne grupe krava, primećena je inhibicija aktivnosti ovog enzima u prisustvu infekcije *S. aureus*, ali bez statističke značajnosti ($P > 0,05$). Analizom dobijenih rezultata aktivnosti SOD u mlečnom serumu utvrđeno je značajno sniženje aktivnosti SOD u mlečnom serumu SCM₁ ($P < 0,05$) i SCM₂ grupe ($P < 0,01$) u poređenju sa kontrolnom grupom krava.



Grafikon 3. Aktivnost enzima SOD (srednja vrednost ± SE) u eritrocitima (A) i mlečnom serumu (B). CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**): značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom.

Tabela 7. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti SOD u eritrocitima kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} (U/gHb)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	2958,0	303,4	114,7	2774,0	3050,0	3123,0	2464,0	3419,0	2678,0	3239,0
SCM ₁	2561,0	750,3	208,1	2018,0	2334,0	3095,0	1640,0	4088,0	2107,0	3014,0
SCM ₂	2532,0	763,4	179,9	2120,0	2337,0	3278,0	706,7	3730,0	2152,0	2912,0

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

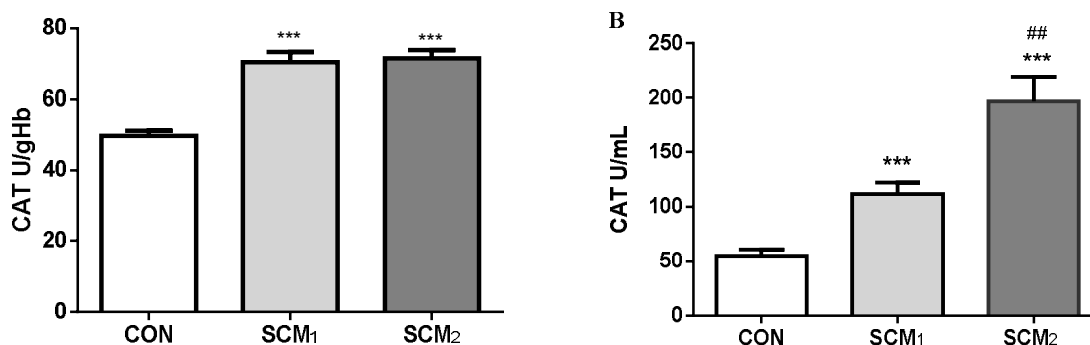
Tabela 8. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti SOD u mlečnom serumu kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} (U/mL)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	59,68	28,41	8,20	31,92	59,38	83,12	21,86	106,90	41,64	77,73
SCM ₁	37,61	18,43	4,76	24,19	39,65	45,07	6,40	81,42	27,40	47,82
SCM ₂	30,55	16,64	4,62	12,97	35,79	45,06	4,08	52,80	20,50	40,61

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

5.5.3. Analiza aktivnosti enzima katalaze

Rezultati analize aktivnosti CAT u eritrocitima krava prikazani su na grafikonu 4 i u tabelama 9 i 10.



Grafikon 4. Aktivnost CAT (srednja vrednost \pm SE) u eritrocitima (A) i mlečnom serumu (B). CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (\geq 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). $P < 0,001$ (***) : značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom; $P < 0,01$ (##) : značajna razlika u poređenju SCM₁ sa SCM₂ grupom.

Analizom dobijenih rezultata za aktivnost ovog enzima u eritrocitima utvrđeno je povećanje aktivnosti CAT usled supkliničke infekcije vimena od 42,03% u SCM₁ i od 44,19% u SCM₂ grupi, u poređenju sa kontrolnom grupom krava, što je na nivou statističke značajnosti $P < 0,001$.

Analizom dobijenih rezultata aktivnosti CAT u mlečnom serumu utvrđeno je povećanje njene aktivnosti kao posledica stafilokokne infekcije vimena u obe grupe krava sa SCM u poređenju sa kontrolnom grupom. Dobijeni rezultati su ukazali da je aktivnost CAT u mlečnom serumu kod SCM₁ grupe bila 2,04 puta viša, a kod SCM₂ grupe 3,60 puta viša u poređenju sa kontrolnom grupom, na nivou statističke značajnosti $P < 0,001$. Poređenjem vrednosti između grupa krava sa SCM utvrđeno je statistički značajno povećanje aktivnosti CAT u mlečnom serumu SCM₂ grupe od 76,34% u poređenju sa SCM₁ grupom ($P < 0,01$).

Tabela 9. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti CAT u eritrocitima kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} (U/gHb)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	49,63	5,20	1,50	47,30	49,96	52,27	36,78	57,04	46,33	52,93
SCM ₁	70,49	17,26	2,88	61,68	65,62	76,58	41,01	121,5	64,65	76,33
SCM ₂	71,56	17,21	2,30	60,48	67,71	80,38	42,41	134,0	66,95	76,17

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

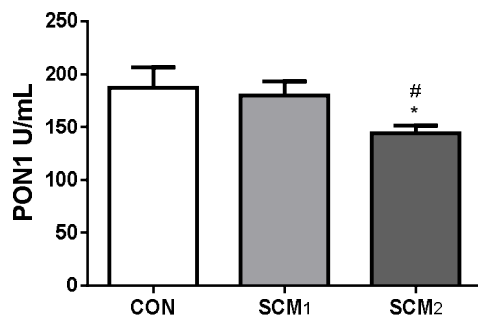
Tabela 10. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti CAT u mlečnom serumu kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} (U/mL)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	54,68	28,60	5,72	33,37	48,33	74,79	11,51	128,90	42,87	66,48
SCM ₁	111,60	35,30	10,64	80,54	108,20	135,80	57,53	179,90	87,92	135,40
SCM ₂	196,80	71,24	22,53	152,10	209,30	262,40	48,33	275,40	145,80	247,70

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

5.5.4. Analiza paraoksonazne aktivnosti paraoksonaze-1

Rezultati analize aktivnosti PON1 prema paraoksonu kao supstratu (paraoksonazna aktivnost PON1) u krvnom serumu krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus* i kontrolne grupe krava prikazani su na grafikonu 5 i u tabeli 11.



Grafikon 5. Paraoksonazna aktivnost PON1 (srednja vrednost \pm SE) u krvnom serumu.

CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*; SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (\geq 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). $P < 0,05$ (*): značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom; $P < 0,05$ (#): značajna razlika u poređenju SCM₁ sa SCM₂ grupom.

Analizom paraoksonazne aktivnosti PON1 između oglednih i kontrolne grupe krava, utvrđeno je značajno sniženje aktivnosti ovog enzima, od 22,72% u krvnom serumu krava SCM₂ grupe ($P < 0,05$). U SCM₁ grupi je utvrđeno sniženje aktivnosti PON1 u poređenju sa kontrolnom grupom, ali bez statističke značajnosti ($P > 0,05$). Međusobnim poređenjem dobijenih vrednosti za paraoksonaznu aktivnost PON1 između grupa krava sa supkliničkim mastitisom utvrđeno je značajno sniženje ($P < 0,05$) aktivnosti ovog enzima u SCM₂ grupi u odnosu na SCM₁ grupu.

Tabela 11. Deskriptivni statistički parametri paraoksonazne aktivnosti PON1 u krvnom serumu kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (\geq 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

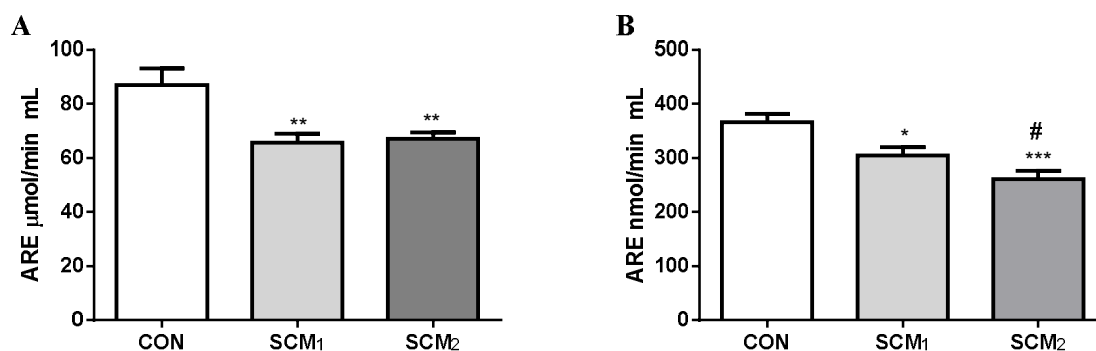
	\bar{X} (U/mL)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	187,1	51,74	19,56	140,80	180,30	248,90	134,10	266,80	139,30	235,00
SCM ₁	180,0	77,36	13,27	111,10	166,60	220,90	86,76	367,60	153,00	207,00
SCM ₂	144,6	49,09	6,87	108,10	138,70	181,40	58,84	271,90	130,80	158,40

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

Zbog toksičnosti samog supstrata za PON1, nisu vršena ispitivanja aktivnosti enzima prema paraoksonu kao supstratu u mlečnom serumu ispitivanih krava.

5.5.5. Analiza arilesterazne aktivnosti paraoksonaze-1

Rezultati analize aktivnosti enzima paraoksonaza prema fenil-acetatu kao supstratu (arilesterazna aktivnost), prikazani su na grafikonu 6 i u tabelama 12 i 13.



Grafikon 6. Aktivnost PON1-ARE (srednja vrednost ± SE) u krvnom serumu (A) i mlečnom serumu (B). CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*; SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***): značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom; $P < 0,05$ (#): značajna razlika u poređenju SCM₁ sa SCM₂ grupom.

Analizom rezultata aktivnosti PON1-ARE utvrđeno je sniženje aktivnosti ovog enzima u krvnom i mlečnom serumu krava kao posledica stafilokokne infekcije vimena. U krvnom serumu je utvrđeno sniženje aktivnosti PON1-ARE od 24,23% u SCM₁ i od 22,71% u i SCM₂ grupi u poređenju sa kontrolnom grupom, a uočena statistički značajna razlika bila je na nivou od $P < 0,01$. Niža aktivnost PON1-ARE utvrđena je i u mlečnom serumu krava sa supkliničkim mastitisom u poređenju sa aktivnošću ovog enzima u mlečnom serumu zdravih, kontrolnih krava. Analizom dobijenih rezultata utvrđena je niža aktivnost PON1-ARE u mlečnom serumu od 16,95% ($P < 0,05$) u SCM₁ grupi, i od 28,60% ($P < 0,01$) u SCM₂ grupi krava u poređenju sa

aktivnošću u mlečnom serumu kontrolne grupe. Poređenjem vrednosti PON1-ARE u mlečnom serumu krava sa supkliničkim mastitisom utvrđeno je značajno sniženje aktivnosti u SCM₂ grupi (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka) u poređenju sa SCM₁ grupom ($P < 0,05$). Potrebno je napomenuti i da je aktivnost PON1-ARE izmerena u krvnom serumu bila za 237,23; 213,75 i 238,14 puta viša u CON, SCM₁ i SCM₂ grupi u odnosu na izmerene vrednosti za aktivnost u mlečnom serumu.

Tabela 12. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti PON1-ARE u krvnom serumu kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} (U/mL)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	86,92	20,49	6,18	64,12	95,04	107,6	60,69	113,40	73,15	100,70
SCM ₁	65,77	18,48	3,27	54,11	66,41	79,87	28,63	104,20	59,10	72,43
SCM ₂	67,18	16,92	2,39	53,82	65,27	80,15	38,39	114,50	62,37	71,99

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

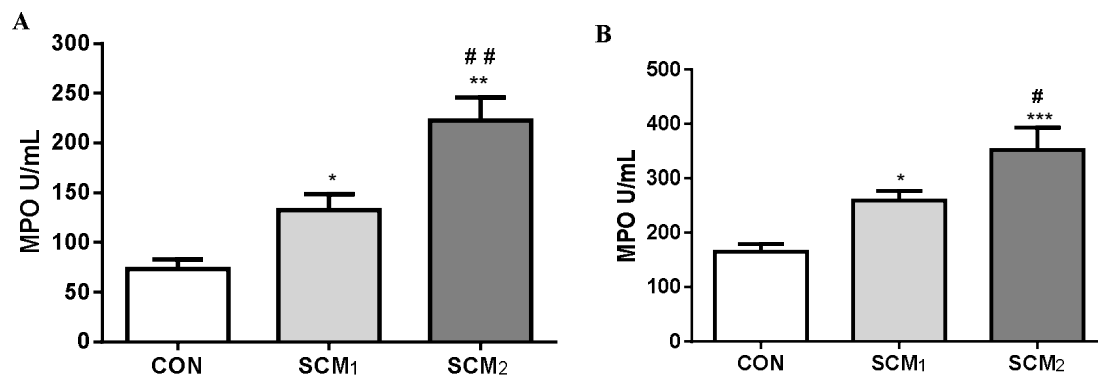
Tabela 13. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti PON1-ARE u mlečnom serumu kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} (mU/mL)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	366,40	87,20	15,18	297,80	366,40	423,70	206,10	526,70	335,50	397,30
SCM ₁	307,70	92,22	12,11	246,20	297,70	366,40	160,30	572,50	283,50	332,00
SCM ₂	282,10	72,05	11,25	251,50	297,70	343,50	114,50	389,30	259,40	304,90

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

5.5.6. Analiza aktivnosti enzima mijeloperoksidaza

Rezultati analize aktivnosti enzima MPO u krvnom i mlečnom serumu SCM grupa i kontrolne grupe krava prikazani su na grafikonu 7 i u tabelama 14 i 15.



Grafikon 7. Aktivnost MPO (srednja vrednost \pm SE) u krvnom serumu (A) i mlečnom serumu (B). CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (\geq 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**): značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom; $P < 0,01$ (##): značajna razlika u poređenju SCM₁ sa SCM₂ grupom.

Analizom dobijenih rezultata utvrđena je značajno viša aktivnost MPO od 80,25% u krvnom serumu krava SCM₁ grupe u poređenju sa kontrolnom grupom, na nivou statističke značajnosti $P < 0,05$. U krvnom serumu SCM₂ grupe utvrđeno je povećanje aktivnosti MPO od 3,03 puta u odnosu na kontrolnu grupu ($P < 0,01$). Međusobnim poređenjem aktivnosti MPO u krvnom serumu krava sa supkliničkim mastitisom utvrđeno je značajno povećanje aktivnosti MPO od 67,82% u SCM₂ grupi u odnosu na SCM₁ grupu ($P < 0,01$).

Analizom dobijenih rezultata aktivnosti MPO u mlečnom serumu utvrđeno je povećanje aktivnosti kao posledica stafilokokne infekcije vimena u obe SCM grupe u poređenju sa kontrolnom grupom. U mlečnom serumu SCM₁ grupe povećanje aktivnosti MPO bilo je od 56,51% u odnosu na kontrolnu grupu krava ($P < 0,05$). Dobijeni rezultati ukazali su da je aktivnost MPO u mlečnom serumu SCM₂ grupe bila 2,13 puta viša u poređenju sa aktivnošću u mlečnom serumu krava kontrolne grupe, na nivou statističke značajnosti od $P < 0,001$. Poređenjem vrednosti između grupa krava sa SCM utvrđeno je statistički značajno povećanje aktivnosti MPO u mlečnom serumu SCM₂ grupe od 35,84% u poređenju sa SCM₁ grupom ($P < 0,01$).

Tabela 14. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti MPO u krvnom serumu kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} (U/mL)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	73,52	31,40	9,47	56,37	67,21	108,40	26,01	117,10	52,43	94,61
SCM ₁	132,70	93,79	15,85	71,55	97,57	158,30	26,02	451,00	100,50	164,90
SCM ₂	222,70	165,20	22,91	104,10	177,80	297,60	26,02	819,60	176,70	268,70

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

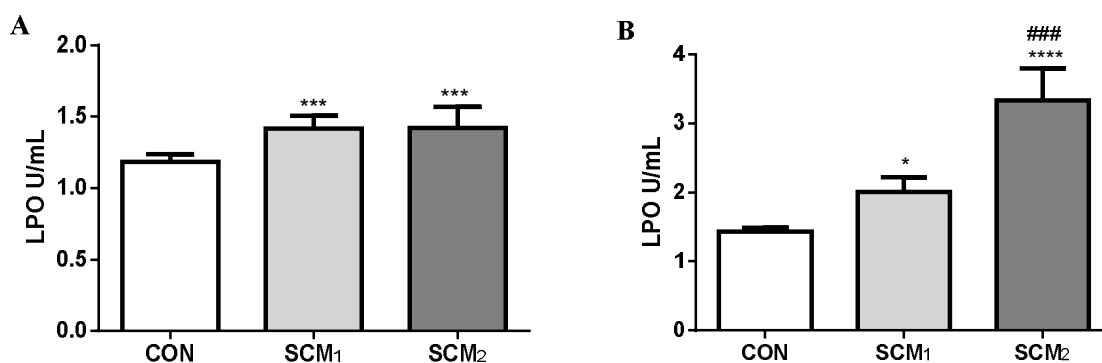
Tabela 15. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti MPO u mlečnom serumu kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} (U/mL)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	165,80	69,24	14,13	106,80	184,30	206,50	58,54	292,70	136,50	195,00
SCM ₁	259,50	143,20	17,11	153,40	242,80	333,40	75,88	956,20	225,30	293,60
SCM ₂	352,50	276,10	41,16	145,30	258,00	507,30	23,85	1437,00	269,60	435,50

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

5.5.7. Analiza aktivnosti enzima laktoperoksidaza

Rezultati analize aktivnosti LPO prikazani su na grafikonu 8 i u tabelama 16 i 17. Analizom dobijenih rezultata aktivnosti LPO uočeno je značajno povećanje aktivnosti ovog enzima u krvnom serumu obe SCM grupe u poređenju sa kontrolnom grupom krava, na nivou statističke značajnosti $P < 0,001$. I u mlečnom serumu uočeno je povećanje aktivnosti LPO u obe SCM grupe, i to za 39,58% u SCM₁ grupi u poređenju sa kontrolnom grupom ($P < 0,05$), dok je u SCM₂ grupi krava u poređenju sa CON utvrđeno povećanje aktivnosti LPO za 2,32 puta ($P < 0,001$). Poređenjem aktivnosti LPO u mlečnom serumu grupa krava sa supkliničkim mastitisom uočeno je značajno povećanje aktivnosti od 66,17% u SCM₂ u odnosu na SCM₁ grupu ($P < 0,001$).



Grafikon 8. Aktivnost LPO (srednja vrednost \pm SE) u krvnom serumu (A) i mlečnom serumu (B). CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (\geq 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). $P < 0,001$ (***) : značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom.

Tabela 16. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti LPO u krvnom serumu kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (\geq 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} (U/mL)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	1,19	0,05	0,02	1,13	1,21	1,23	1,11	1,23	1,130	1,240
SCM ₁	1,42	0,92	0,03	1,36	1,40	1,47	1,30	1,65	1,358	1,475
SCM ₂	1,42	0,15	0,04	1,27	1,42	1,55	1,27	1,67	1,330	1,515

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

Tabela 17. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti LPO u mlečnom serumu kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 (\geq 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (\geq 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} (U/mL)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	1,44	0,24	0,05	1,22	1,39	1,59	1,06	1,88	1,32	1,55
SCM ₁	2,01	1,20	0,22	1,19	1,62	2,11	1,05	6,47	1,56	2,45
SCM ₂	3,34	1,68	0,47	1,59	2,81	5,04	1,23	5,85	2,32	4,35

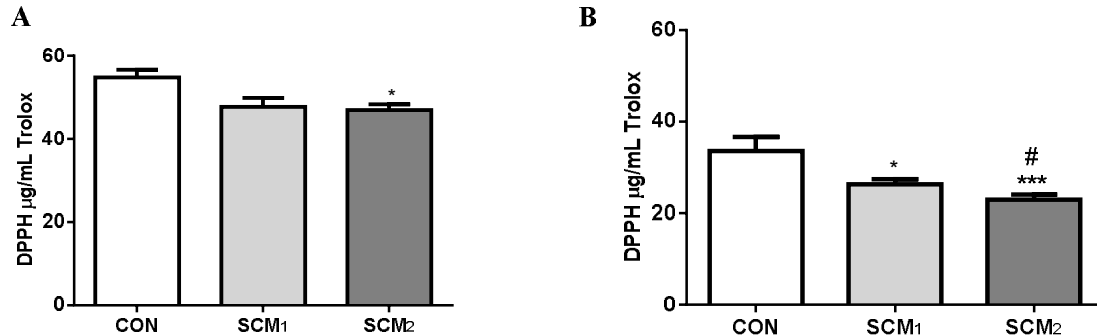
\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

5.5.8. Analiza ukupnog antioksidativnog kapaciteta

Da bismo utvrdili da li postoji razlika u koncentracijama ukupnog antioksidativnog kapaciteta između zdravih i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus* u radu smo analizirali TAC u krvnom i mlečnom serumu preko dva testa: određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala i određivanje sposobnosti neutralizacije ABTS radikla.

5.5.8.1. Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala

Na grafikonu 9 i u tabelama 18 i 19 su prikazani rezultati analize ukupnog antioksidativnog kapaciteta preko DPPH testa.



Grafikon 9. Koncentracija DPPH (srednja vrednost \pm SE) u krvnom serumu (A) i mlečnom serumu (B). CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*; SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (\geq 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). $P < 0,05$ (*), $P < 0,001$ (***) : značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom; $P < 0,05$ (#) : značajna razlika u poređenju SCM₁ sa SCM₂ grupom.

Analizom koncentracije TAC izražene preko DPPH u krvnom serumu zdravih krava i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*, utvrđene su niže koncentracije DPPH u obe SCM grupe, ali je statistički značajno sniženje od 14,32% uočeno samo u SCM₂ grupi u poređenju sa kontrolnom grupom ($P < 0,05$). U mlečnom serumu SCM₁ grupe utvrđene su niže

koncentracije DPPH, i to od 21,67 % ($P < 0,05$) u SCM_1 , i od 31,65% ($P < 0,001$) u SCM_2 grupi u poređenju sa koncentracijama u mlečnom serumu kontrolne grupe krava. Međusobnim poređenjem oglednih grupa krava utvrđeno je značajno sniženje ukupnog antioksidativnog kapaciteta u mlečnom serumu SCM_2 grupe (12,73%, $P < 0,05$) u odnosu na koncentracije izmerene u SCM_1 grupi. Izmerene vrednosti za koncentraciju TAC izraženu preko DPPH bile su za 2,03 puta više u krvnom serumu SCM_2 grupe u poređenju sa mlečnim serumom istih jedinki.

Tabela 18. Deskriptivni statistički parametri TAC preko DPPH u krvnom serumu kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*, SCM_1 grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM_2 grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} ($\mu\text{g/mL}$)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	54,80	5,54	1,847	49,91	54,99	58,81	48,22	65,16	50,54	59,06
SCM_1	47,70	12,29	2,108	37,97	46,90	51,60	28,74	80,19	43,41	51,99
SCM_2	46,95	9,12	1,316	41,15	49,38	52,84	25,77	61,34	44,30	49,60

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

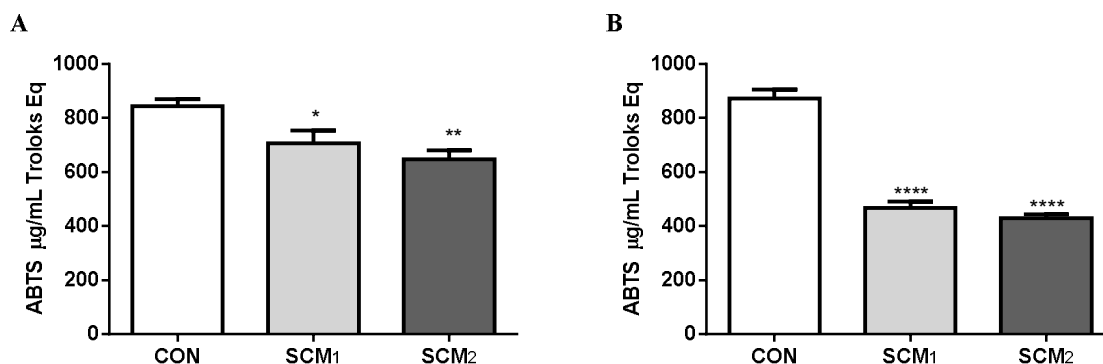
Tabela 19. Deskriptivni statistički parametri TAC preko DPPH u mlečnom serumu kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM_1 grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM_2 grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} ($\mu\text{g/mL}$)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	33,59	19,17	3,11	16,23	29,82	56,63	10,11	65,94	27,28	39,89
SCM_1	26,31	9,14	1,17	21,26	24,06	30,50	9,88	54,03	23,97	28,65
SCM_2	22,96	9,41	1,11	17,57	20,66	29,50	3,71	49,55	20,75	25,17

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

5.5.8.2. Određivanje sposobnosti neutralizacije ABTS radikala

Rezultati analize ukupnog antioksidativnog kapaciteta izraženih preko sposobnosti neutralizacije ABTS radikala u ispitivanim uzorcima krvnog i mlečnog seruma, prikazani su na grafikonu 10 i u tabelama 20 i 21.



Grafikon 10. Koncentracija ABTS (srednja vrednost \pm SE) u krvnoj plazmi (A) i mlečnom serumu (B). CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (\geq 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**): značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom.

Analizom dobijenih rezultata utvrđeno je značajno sniženje koncentracije ABTS u krvnom serumu obe SCM grupe u poređenju sa kontrolnom grupom, i to od 16,48% ($P < 0,05$) u SCM₁ i od 23,30% ($P < 0,01$) u SCM₂ grupi. U mlečnom serumu utvrđene su značajno niže koncentracije ABTS u obe grupe krava sa supkliničkim mastitisom, od 46,37% u SCM₁ i od 50,37% u SCM₂ grupi u poređenju sa CON, što je na nivou statističke značajnosti od $P < 0,001$.

Tabela 20. Deskriptivni statistički parametri TAC preko ABTS testa u krvnom serumu kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (\geq 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} (µg/mL)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	844,60	83,14	24,00	762,20	837,80	930,70	744,90	955,70	791,80	897,40
SCM ₁	705,40	227,20	47,37	460,80	835,80	914,10	370,90	964,50	607,10	803,60
SCM ₂	647,80	215,40	32,47	476,40	552,70	881,30	290,00	1009,00	582,30	713,30

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

Tabela 21. Deskriptivni statistički parametri TAC preko ABTS testa u mlečnom serumu kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (\geq 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} ($\mu\text{g/mL}$)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	872,80	130,30	33,64	797,40	837,40	954,60	640,10	1120,00	800,70	945,00
SCM ₁	468,10	172,90	22,71	329,20	403,00	590,50	227,70	963,70	422,60	513,60
SCM ₂	428,80	118,50	15,30	360,00	402,50	521,10	180,10	717,70	398,20	459,40

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

5.6. Analiza parametara lipidne peroksidacije

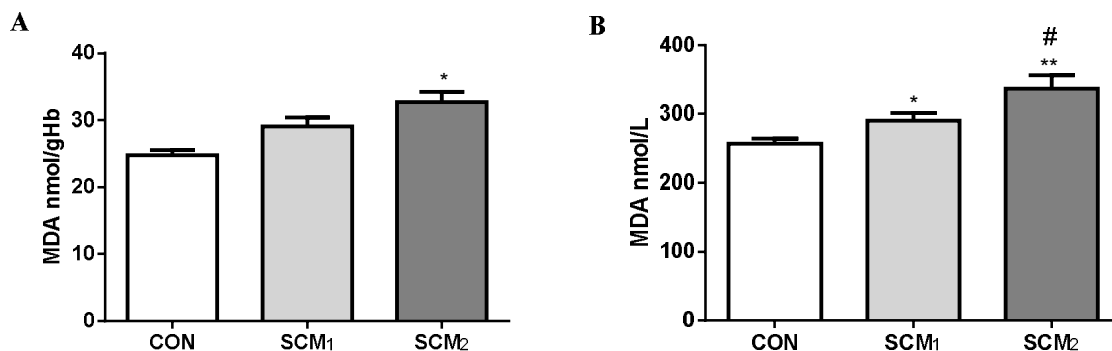
Kako bismo ispitali da li postoji razlika na nivou lipidne peroksidacije pri infekciji vimena krava sa *S. aureus* određivane su koncentracije MDA i LOOH.

5.6.1. Analiza koncentracije malondialdehida

Rezultati ispitivanja stepena lipidne peroksidacije preko koncentracije MDA su prikazani na grafikonu 11 i u tabelama 22 i 23.

Analizom dobijenih rezultata utvrđen je veći stepen oštećenja ćelijske membrane eritrocita kod SCM₂ grupe, sa povećanjem koncentracije MDA od 32,20% u poređenju sa kontrolnom grupom ($P < 0,05$). Više koncentracije MDA utvrđene su i kod SCM₁ grupe krava u poređenju sa kontrolnom grupom, ali bez statističke značajnosti ($P > 0,05$).

Analizom rezultata koncentracije MDA u mlečnom serumu utvrđene su više koncentracije MDA u SCM₁ (13,13%, $P < 0,05$) i u SCM₂ grupi (31,40%, $P < 0,01$), u poređenju sa koncentracijama u mlečnom serumu kontrolne grupe krava. Poređenjem koncentracije MDA u mlečnom serumu između grupa krava sa SCM utvrđene su više koncentracije MDA u SCM₂ grupi u odnosu na SCM₁ grupu, na nivou statističke značajnosti $P < 0,05$.



Grafikon 11. Koncentracije MDA (srednja vrednost \pm SE) u eritrocitima (A) i mlečnom serumu (B). C – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (\geq 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**): značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom; $P < 0,05$ (#): značajna razlika u poređenju SCM₁ sa SCM₂ grupom.

Tabela 22. Deskriptivni statistički parametri koncentracije MDA u eritrocitima kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (\geq 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} (nmol/gHb)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	24,78	2,17	0,72	23,17	24,65	26,59	21,03	27,93	23,11	26,45
SCM ₁	29,06	8,24	1,35	22,39	29,86	34,88	14,02	45,77	26,31	31,81
SCM ₂	32,76	9,68	1,49	25,33	30,88	39,76	20,29	66,04	29,74	35,78

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

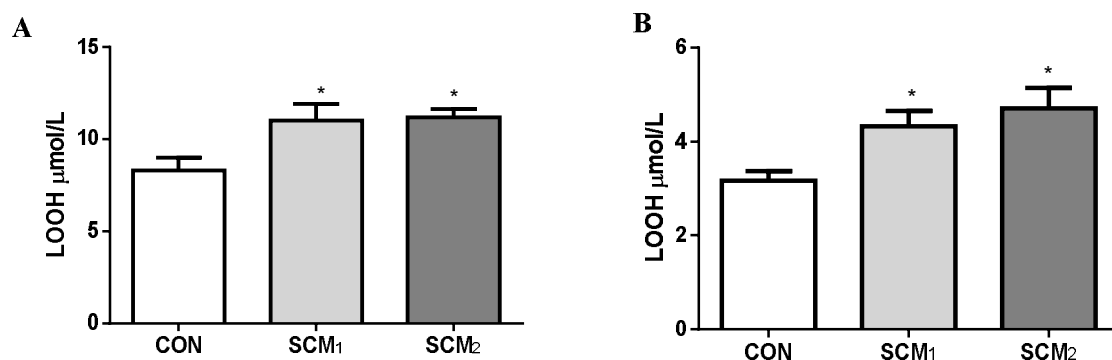
Tabela 23. Deskriptivni statistički parametri koncentracije MDA u mlečnom serumu kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (\geq 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} (nmol/L)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	256,70	42,96	7,37	227,60	246,80	293,30	182,70	337,50	241,7	271,7
SCM ₁	290,40	84,41	11,60	229,20	266,00	315,70	192,30	679,50	267,1	313,7
SCM ₂	337,30	148,70	19,70	251,60	293,10	367,00	201,90	1032,00	297,8	376,7

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

5.6.2. Analiza koncentracije lipidnih-hidroperoksida

Na grafikonu 12 i u tabelama 24 i 25 prikazani su rezultati ispitivanja koncentracije LOOH u krvnoj plazmi i mlečnom serumu krava sa supkliničkim mastitisom i zdravih, kontrolnih jedinki.



Grafikon 12. Koncentracije LOOH (srednja vrednost \pm SE) u krvnoj plazmi (A) i mlečnom serumu (B). CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (\geq 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). $P < 0,05$ (*): značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom.

Uočene su značajno više ($P < 0,05$) koncentracije LOOH u krvnoj plazmi, kod grupa krava sa supkliničkim mastitisom (SCM₁ i SCM₂), u odnosu na koncentracije zabeležene kod kontrolnih krava. Povećanje koncentracije LOOH bilo je od 32,37% u SCM₁ grupi, i od 34,66% u SCM₂ grupi, u poređenju sa kontrolnom grupom. Isti nivo statističke značajnosti ($P < 0,05$), utvrđen je analizom koncentracija LOOH u mlečnom serumu grupa krava sa SCM, u poređenju sa kontrolnom grupom. Povećanje koncentracije LOOH bilo je od 36,28%, u mlečnom serumu krava SCM₁ grupe i od 48,58% u mlečnom serumu SCM₂ grupe, u poređenju sa koncentracijama u mlečnom serumu kontrolnih krava.

Tabela 24. Deskriptivni statistički parametri koncentracije LOOH u krvnoj plazmi kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} (μmol/L)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	8,31	1,51	0,67	6,80	9,23	9,35	5,93	9,37	6,44	10,18
SCM ₁	11,00	2,01	0,90	9,13	11,10	12,82	8,03	13,10	8,50	13,49
SCM ₂	11,19	0,96	0,43	10,38	10,90	12,15	10,23	12,60	9,99	12,38

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

Tabela 25. Deskriptivni statistički parametri koncentracije LOOH u mlečnom serumu kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} (μmol/L)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	3,17	0,45	0,19	2,70	3,40	3,53	2,60	3,63	2,62	3,73
SCM ₁	4,32	0,74	0,33	3,85	4,00	4,95	3,80	5,60	3,40	5,24
SCM ₂	4,71	1,06	0,43	3,73	4,60	5,49	3,73	6,43	3,60	5,82

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

5.7. Ispitivanje parametara nitrozativnog stresa

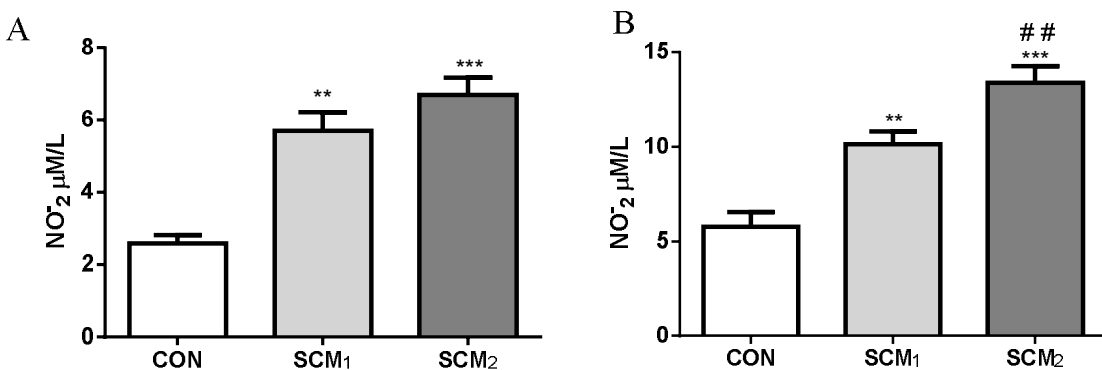
Da bi utvrdili da li postoji razlika na nivou nitrozativnog stresa, stanja u kome stvaranje visoko reaktivnih vrsta azota prevazilazi sposobnost bioloških sistema da spreče oksidativne promene na proteinima, analizirali smo koncentracije nitrita, uznapredovalih proizvoda oksidacije proteina i koncentracije tiolnih grupa, u krvnoj plazmi i mlečnom serumu krava sa supkliničkim mastitisom i zdravih krava.

5.7.1. Analiza koncentracije nitrita

Rezultati analize koncentracije NO₂⁻ su prikazani na grafikonu 13 i u tabelama 26 i 27. Analizom dobijenih rezultata utvrđene su značajno više koncentracije NO₂⁻ u krvnoj plazmi i mlečnom serumu kod krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*, u poređenju sa

kontrolnom grupom. Koncentracije NO_2^- bile su za 2,21 puta više u krvnoj plazmi SCM_1 grupe ($P < 0,01$), i za 2,59 puta više u krvnoj plazmi SCM_2 grupe ($P < 0,001$) u poređenju sa vrednostima izmerenim kod kontrolne grupe.

Više koncentracije NO_2^- utvrđene su i u mlečnom serumu krava sa supkliničkim mastitisom u odnosu na koncentracije u mlečnom serumu kontrolne grupe. U mlečnom serumu SCM_1 grupe koncentracije NO_2^- su bile od 75,87% više u poređenju sa koncentracijama NO_2^- u mlečnom serumu krava kontrolne grupe ($P < 0,01$). Najviše koncentracije NO_2^- utvrđene su u mlečnom serumu krava SCM_2 grupe, a povećanje je bilo za 2,32 puta u odnosu na koncentracije NO_2^- u mlečnom serumu kontrolnih krava ($P < 0,001$).



Grafikon 13. Koncentracije NO_2^- (srednja vrednost \pm SE) u krvnoj plazmi (A) i mlečnom serumu (B). CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM_1 grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM_2 grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***) : značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom; $P < 0,01$ (##): značajna razlika u poređenju SCM_1 sa SCM_2 grupom.

Tabela 26. Deskriptivni statistički parametri koncentracije NO_2^- u krvnoj plazmi kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM_1 grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM_2 grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} (μM/L)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	2,58	0,66	0,24	2,07	2,36	3,25	1,92	3,69	2,04	3,13
SCM ₁	5,71	2,72	0,50	3,29	5,31	7,94	2,08	11,26	4,68	6,75
SCM ₂	6,70	2,98	0,48	4,24	5,97	8,37	3,04	13,16	5,73	7,66

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

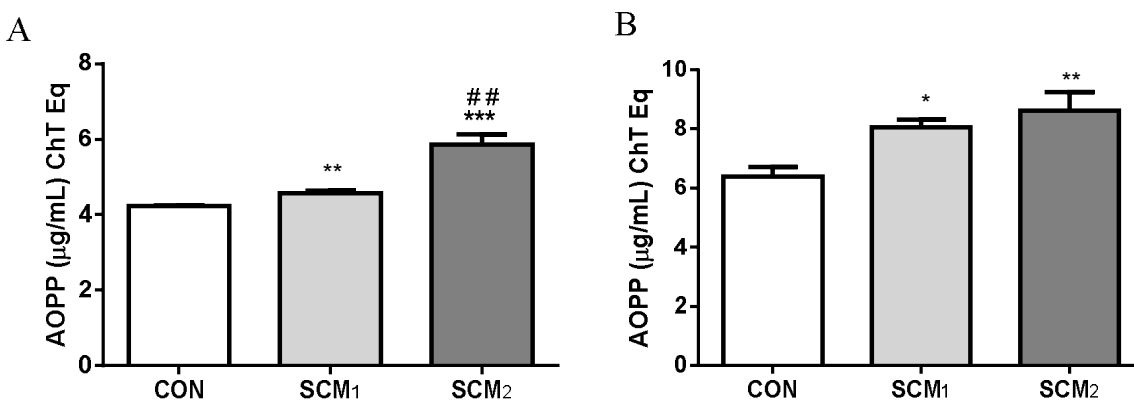
Tabela 27. Deskriptivni statistički parametri koncentracije NO_2^- u mlečnom serumu kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM_1 grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM_2 grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} ($\mu\text{M/L}$)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	5,76	3,25	0,79	3,76	5,04	7,52	0,36	12,43	4,09	7,43
SCM_1	10,13	3,79	0,68	7,35	9,57	11,75	5,09	21,39	8,75	11,52
SCM_2	13,38	5,71	0,88	9,23	13,25	16,68	3,77	29,97	11,60	15,15

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

5.7.2. Analiza koncentracije uznapredovalih proizvoda oksidacije proteina

Na grafikonu 14 u tabelama 28 i 29 prikazani su rezultati ispitivanja koncentracije AOPP u krvnoj plazmi i mlečnom serumu krava sa supkliničkim mastitisom i kontrolnih, zdravih krava.



Grafikon 14. Koncentracija AOPP (srednja vrednost \pm SE) u krvnoj plazmi (A) i mlečnom serumu (B). CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM_1 grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM_2 grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***): značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom; $P < 0,01$ (##): značajna razlika u poređenju SCM_1 sa SCM_2 grupom.

Analizom koncentracije AOPP utvrđene su značajno više koncentracije u krvnoj plazmi krava sa supkliničkim mastitisom, od 8,04% ($P < 0,01$) u SCM_1 , i od 38,53% ($P < 0,001$) u SCM_2

grupi u poređenju sa koncentracijama AOPP kod kontrolnih krava. Poređenjem koncentracija AOPP između grupa krava sa supkliničkim mastitisom utvrđene su značajno više koncentracije u krvnoj plazmi krava sa ≥ 1000 CFU/mL *S. aureus* u odnosu na koncentracije u SCM₁ grupi (28,23%, $P < 0,01$).

Značajno više koncentracije AOPP utvrđene su i u mlečnom serumu krava sa supkliničkim mastitisom, a povećanje je bilo od 25,98% u SCM₁ grupi ($P < 0,05$), i od 34,74% ($P < 0,01$) u SCM₂ grupi, u poređenju sa koncentracijama izmerenim u mlečnom serumu zdravih, kontrolnih krava.

Tabela 28. Deskriptivni statistički parametri koncentracije AOPP u krvnoj plazmi kontrolne grupe krava (CON), i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} ($\mu\text{mol/mL}$)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	4,23	0,09	0,03	4,13	4,23	4,28	4,12	4,39	4,15	4,30
SCM ₁	4,57	0,22	0,07	4,36	4,50	4,79	4,28	4,92	4,39	4,74
SCM ₂	5,86	0,82	0,27	5,35	5,67	6,02	5,08	7,87	5,23	6,49

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

Tabela 29. Deskriptivni statistički parametri koncentracije AOPP u mlečnom serumu kontrolne grupe krava (CON), i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

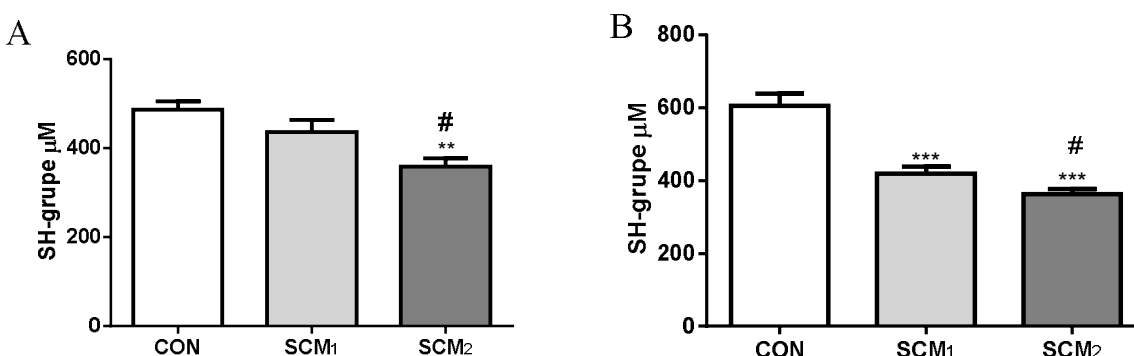
	\bar{X} ($\mu\text{mol/mL}$)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	6,39	0,99	0,33	5,59	5,89	7,18	5,35	8,24	5,62	7,15
SCM ₁	8,05	0,88	0,28	7,48	8,16	8,69	6,42	9,21	7,42	8,68
SCM ₂	8,61	1,98	0,63	7,16	8,22	9,86	6,37	12,58	7,19	10,03

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

5.7.3. Analiza koncentracije tiolnih grupa

Rezultati ispitivanja koncentracije SH-grupa prikazani su na grafikonu 15 i u tabelama 30 i 31. Analizom koncentracije SH-grupa između krava sa supkliničkim mastitisom i kontrolne grupe, utvrđene su niže koncentracije SH-grupa u krvnoj plazmi krava usled prisustva stafilokokne infekcije. U krvnoj plazmi SCM₂ grupe niže koncentracije SH-grupa od 26,39% izmerene su u poređenju sa kontrolnom grupom, što je na nivou statističke značajnosti $P < 0,01$. Poređenjem koncentracija SH-grupa u krvnoj plazmi SCM₁ grupe i kontrolne grupe krava, primećene su niže koncentracije SH-grupa u SCM₁ grupi, ali bez statističke značajnosti. Poređenjem koncentracije SH-grupa između grupa krava sa supkliničkim mastitisom utvrđene su značajno niže koncentracije u krvnoj plazmi SCM₂ grupe u poređenju sa SCM₁ grupom (18,04%, $P < 0,05$).

Analizom rezultata koncentracije SH-grupa u mlečnom serumu krava utvrđene su značajno niže koncentracije SH-grupa u grupama krava sa SCM (30,64% SCM₁ i 40,01% SCM₂ grupe) u poređenju sa koncentracijama SH-grupa u mlečnom serumu kontrolnih krava ($P < 0,001$). Poređenjem vrednosti za dobijene koncentracije SH-grupa između krava sa supkliničkim mastitisom, značajno niže koncentracije ($P < 0,05$) izmerene su u mlečnom serumu SCM₂ grupe u odnosu na SCM₁ grupu.



Grafikon 15. Koncentracija SH-grupa (srednja vrednost \pm SE) u krvnoj plazmi (A) i mlečnom serumu (B). CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*; SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). $P < 0,01$ (**): značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom; $P < 0,05$ (#) značajna razlika u poređenju SCM₁ sa SCM₂ grupom.

Tabela 30. Deskriptivni statistički parametri koncentracije SH-grupa u krvnoj plazmi kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} (μM)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	486,50	52,34	18,51	436,40	475,70	543,10	419,50	558,10	442,70	530,20
SCM ₁	436,90	130,70	26,68	298,20	446,70	554,40	237,80	636,80	381,70	492,10
SCM ₂	358,10	104,60	18,79	282,80	335,20	475,70	183,50	528,10	319,70	396,50

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

Tabela 31. Deskriptivni statistički parametri koncentracije SH-grupa u mlečnom serumu kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} (μM)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	605,10	178,30	33,11	455,10	651,80	734,10	265,90	889,00	537,20	672,90
SCM ₁	419,70	115,70	18,30	336,20	404,50	523,40	223,70	629,30	382,70	456,70
SCM ₂	363,00	88,20	13,45	292,20	344,60	423,30	209,80	561,80	335,80	390,10

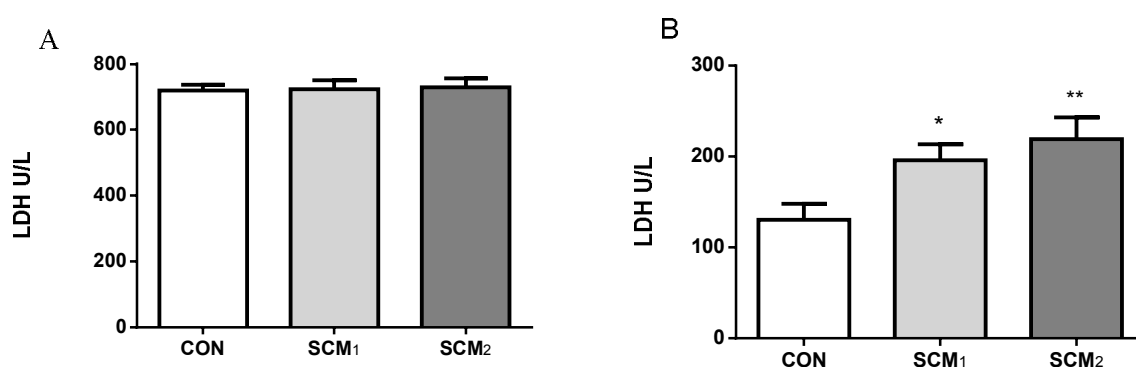
\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

5.8. Analiza enzima laktat-dehidrogenaze (LDH)

U cilju ispitivanja stepena oštećenja ćelijskih membrana kod krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim sa *S. aureus* u radu je određivana ukupna aktivnost LDH, kao i distribucija izoformi ovog enzima.

5.8.1. Analiza ukupne aktivnosti laktat-dehidrogenaza

Rezultati ukupne aktivnosti LDH u krvnom i mlečnom serumu prikazani su na grafikonu 16 i u tabelama 32 i 33. Analizom ukupne aktivnosti LDH u krvnom serumu oglednih grupa i kontrolne grupe krava, primećen je porast aktivnosti ovog enzima u prisustvu infekcije *S. aureus*, ali bez statističke značajnosti ($P > 0,05$). Analizom dobijenih rezultata ukupne aktivnosti LDH u mlečnom serumu, utvrđeno je značajno povećanje aktivnosti u mlečnom serumu SCM_1 grupe od 29,22% ($P < 0,05$) i od 45,00% SCM_2 grupe ($P < 0,01$), u poređenju sa kontrolnom grupom.



Grafikon 16. Aktivnost LDH (srednja vrednost \pm SE) u krvnom serumu (A) i mlečnom serumu (B). CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM_1 grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM_2 grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). $P < 0.05$ (*): značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom.

Tabela 32. Deskriptivni statistički parametri ukupne aktivnosti LDH u krvnom serumu kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM_1 grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM_2 grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} (U/L)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	719,1	48,62	17,19	668,10	719,80	765,40	645,90	767,90	678,4	759,7
SCM ₁	723,4	129,10	28,18	630,50	761,70	820,30	443,70	906,00	664,6	782,1
SCM ₂	729,9	109,70	26,60	644,60	711,20	806,70	580,60	935,50	673,5	786,3

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

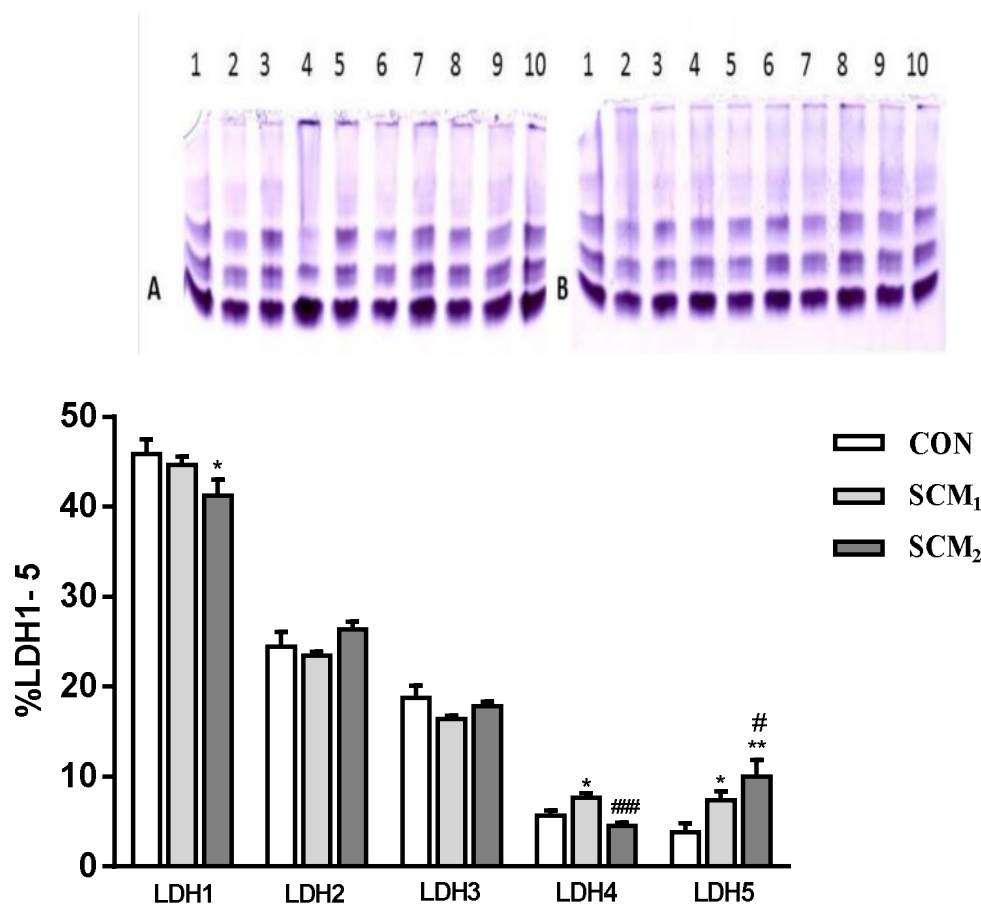
Tabela 33. Deskriptivni statistički parametri aktivnosti LDH u mlečnom serumu kontrolne grupe krava (CON) i krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka).

	\bar{X} (U/L)	SD	SE	DK	Mediana	GK	Min	Max	-95% IP	+95% IP
CON	150,90	86,51	21,63	87,22	113,30	204,20	64,31	347,30	104,8	197,0
SCM ₁	195,70	74,27	18,01	128,60	183,60	221,90	115,80	405,10	157,5	233,8
SCM ₂	218,80	97,83	24,46	141,50	207,60	248,50	109,30	520,90	166,7	270,9

\bar{X} = srednja vrednost; SD = standardna devijacija; SE = standardna greška; DK = donji kvartal; GK = gornji kvartal; Min/Max = najniža i najviša izmerena vrednost; -95%/+95% IP = intervali pouzdanosti

5.8.2. Ispitivanje distribucije izoenzima LDH u plazmi

Rezultati aktivnosti izoenzima LDH kod krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim sa *S. aureus* i zdravih, kontrolnih krava, u krvnom i mlečnom serumu, prikazani su na grafikonu 17. Analizom aktivnosti izoenzimskog oblika LDH1 uočava se sniženje aktivnosti u SCM₂ grupi krava u odnosu na kontrolnu grupu ($P < 0,05$). Utvrđena je viša aktivnost izoenzimskog oblika LDH4 kod SCM₁ grupe u poređenju sa kontrolnom grupom ($P < 0,05$). Analizom aktivnosti izoenzima LDH4 između grupa krava sa supkliničkim mastitisom utvrđeno je značajno sniženje aktivnosti ovog izoenzima LDH u SCM₂ grupi u odnosu na aktivnost u SCM₁ grupi ($P < 0,001$). Analizom aktivnosti izoenzima LDH5 utvrđena je povišena aktivnost u prisustvu infekcije vimena *S. aureus*, na nivou statističke značajnosti $P < 0,05$ u SCM₁ i $P < 0,01$ u SCM₂ grupi u poređenju sa aktivnošću ovog izoenzima kod kontrolnih krava. Poređenjem aktivnosti LDH5 između grupa krava sa supkliničkim mastitisom uočena je viša aktivnost ovog izoenzima LDH u SCM₂ grupi u odnosu na SCM₁ grupu ($P < 0,05$).



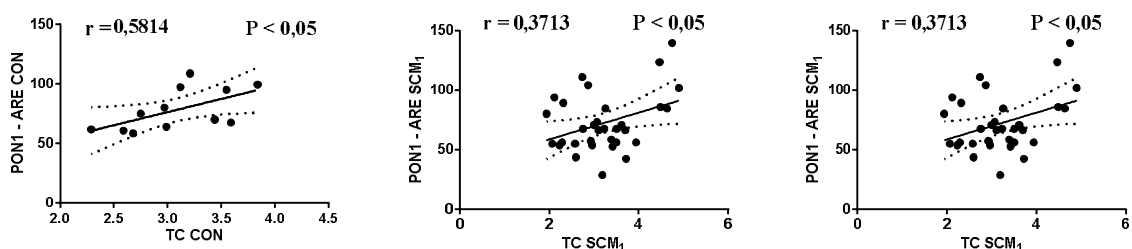
Grafikon 17. Aktivnost izoenzima LDH (srednja vrednost \pm SE) u krvnom serumu; (CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (\geq 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). CON (1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 6A), SCM₁ (6B, 7B, 8B, 9B, 10B), SCM₂ (1B, 2B, 3B, 4B, 5B, 7A, 8A, 9A, 10A) $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**): značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom; $P < 0.05$ (#), $P < 0.001$ (###): značajna razlika u poređenju SCM₁ sa SCM₂ grupom.

5.9. Korelacione analize između pojedinih ispitivanih parametara

5.9.1. Analiza korelacione povezanosti PON1-ARE i TC

Rezultati korelacione analize između PON1-ARE i ukupnog holesterola u krvnom serumu krava sa supkliničkim mastitisom (SCM₁ i SCM₂ grupa) i kontrolnih, zdravih krava su prikazani na grafikonu 18. Pozitivna korelacija sa statističkom značajnošću je utvrđena između

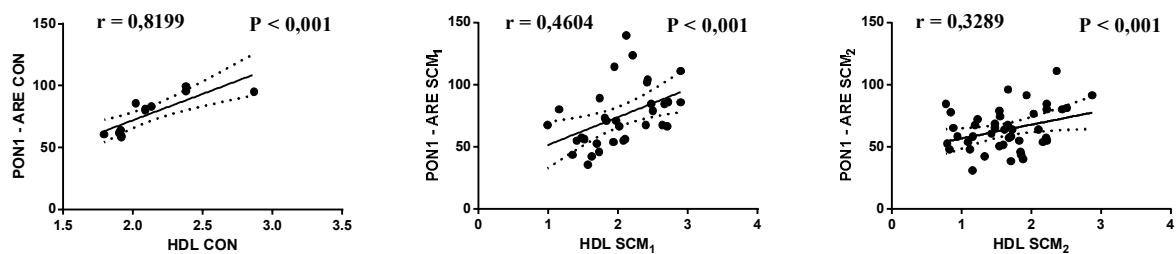
arilesterazne aktivnosti PON1 i koncentracije TC u svim ispitivanim grupama krava ($P < 0,05$). Utvrđena korelacije bila je umerene jačine u CON ($r = 0,5814$), slaba u SCM_1 ($r = 0,3713$) i u SCM_2 ($r = 0,3713$).



Grafikon 18. Korelacija između PON1-ARE i TC u krvnom serumu; CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM_1 grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM_2 grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). Statistička značajnost $P < 0,05$ (*).

5.9.2. Analiza korelacione povezanosti PON -ARE i HDL

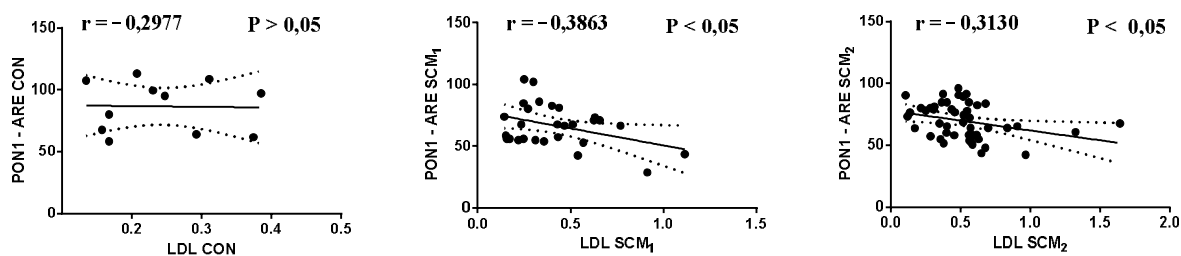
Rezultati korelacione analize između aktivnosti ARE i HDL u krvnom serumu krava sa supkliničkim mastitisom i kontrolne grupe, prikazani su na grafikonu 19. Uočena je pozitivna korelacija sa visokom statističkom značajnošću ($P < 0,001$) između arilesterazne aktivnosti PON1 i HDL u svim ispitivanim grupama. Veoma jaka korelacija sa statističkom značajnošću između navedenih parametara utvrđena je kod kontrolne grupe krava ($r = 0,8199$; $P < 0,001$), dok je kod SCM_1 utvrđena korelacija bila umerene jačine ($r = 0,4604$; $P < 0,001$) i slaba korelacija u SCM_2 grupi ($r = 0,3289$; $P < 0,001$).



Grafikon 19. Korelacija između PON-ARE i HDL u krvnom serumu; CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). Statistička značajnost $P < 0,001$ (***)

5.9.3. Analiza korelacione povezanosti arilesterazne aktivnosti PON1-ARE i LDL

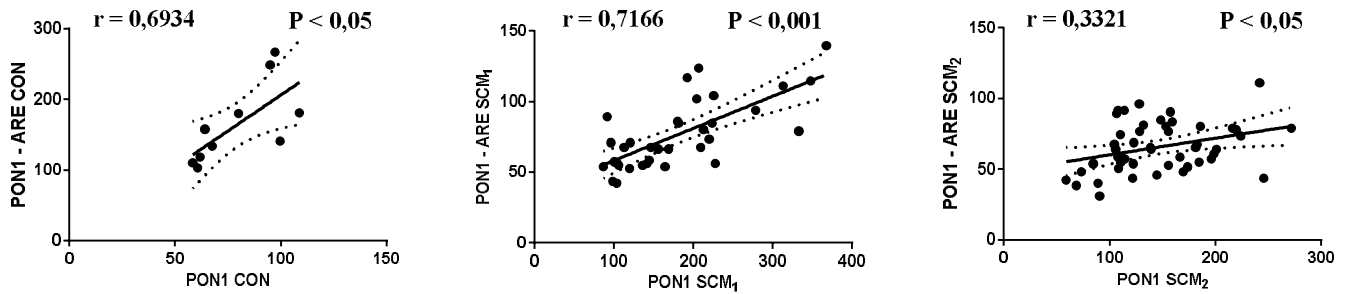
Povezanost aktivnosti PON1-ARE i LDL u krvnom serumu krava sa supkliničkim mastitisom (SCM₁ i SCM₂ grupa) i kontrolne grupe krava su prikazani na grafikonu 20. Slaba negativna korelacija sa statističkom značajnošću, uočena je između arilesterazne aktivnosti PON1 i koncentracije LDL kod grupa krava sa supkliničkim mastitisom ($P < 0,05$), dok kod kontrolne grupe krava nije utvrđena statistički značajna povezanost između navedenih parametara.



Grafikon 20. Korelacija između PON1-ARE i LDL u krvnom serumu; CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). Statistička značajnost $P < 0,05$ (*), $P > 0,05$ (^{ns}).

5.9.4. Analiza korelacione povezanosti PON1-ARE i PON1

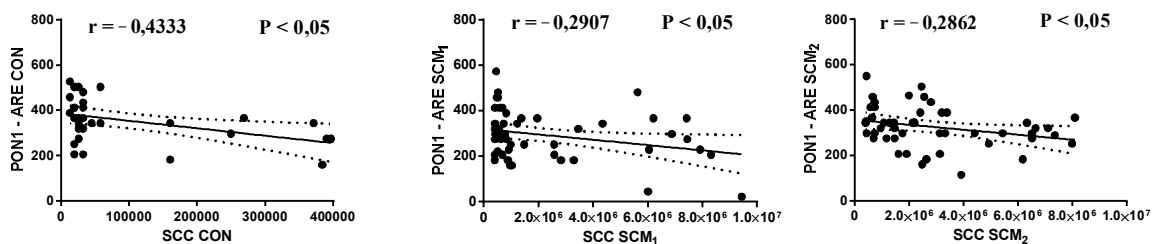
Na grafikonu 21 su prikazani rezultati korelacione povezanosti između arilesterazne i paraoksonazne aktivnosti PON1 u krvnom serumu. Analizom korelacione povezanosti između aktivnosti PON1-ARE i paraoksonazne aktivnosti PON1, utvrđena je pozitivna korelacija između aktivnosti ovog enzima u krvnom serumu svih ispitivanih grupa. Uočena korelacija bila je jaka kod kontrolne grupe krava, ($r = 0,6934$; $P < 0,05$) i SCM₁ grupe ($r = 0,7166$; $P < 0,001$), dok je kod SCM₂ grupe utvrđena slaba korelacija između ispitivanih parametara ($r = 0,3321$; $P < 0,05$).



Grafikon 21. Korelacija aktivnosti PON1-ARE i PON1 u krvnom serumu; CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM_1 grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM_2 grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). Statistička značajnost $P < 0,05$ (*), $P < 0,001$ (***)

5.9.5. Analiza korelacione povezanosti aktivnosti PON1-ARE i SCC

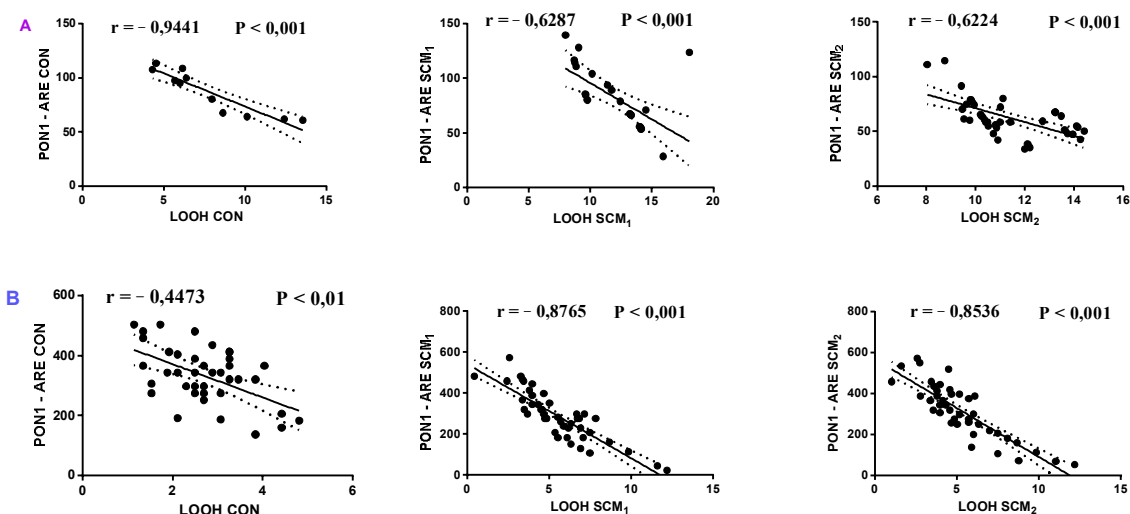
Da bi utvrdili da li postoji međusobna povezanost između aktivnosti PON1-ARE i SCC izvršena je korelaciona analiza, a rezultati su prikazani na grafikonu 22. Analizom dobijenih rezultata utvrđena je negativna korelacija između PON1 i SCC kod svih ispitivanih grupa na nivou statističke značajnosti $P < 0,05$. Uočena korelacija bila je umerene jačine kod CON ($r = -0,4333$), i slaba kod SCM_1 ($r = -0,2907$) i SCM_2 grupe ($r = -0,2862$).



Grafikon 22. Korelacija PON1-ARE i SCC u mleku; CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM_1 grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM_2 grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). Statistička značajnost $P < 0,05$ (*).

5.9.6. Analiza korelacione povezanosti aktivnosti PON1-ARE i LOOH

Rezultati korelacione analize između PON1 i LOOH u krvnom i mlečnom serumu, i korelacija između PON1-ARE aktivnosti u krvnom i mlečnom serumu, prikazane su na grafikonu 23. Negativna korelacija sa statističkom značajnošću utvrđena je između aktivnosti PON1-ARE i LOOH u svim grupama krava. Veoma jaka negativna korelacija PON1-ARE i LOOH utvrđena je u krvnom serumu kontrolne grupe krava ($r = -0,9441$, $P < 0,001$), i jaka negativna korelacija u SCM_1 ($r = -0,6287$; $P < 0,001$) i SCM_2 grupi ($r = -0,6224$; $P < 0,001$). U obe grupe krava sa supkliničkim mastitisom korelacija između PON1-ARE i LOOH u mlečnom serumu bila je veoma jaka SCM_1 ($r = -0,8765$, $P < 0,001$) i u SCM_2 ($r = -0,8536$, $P < 0,001$).

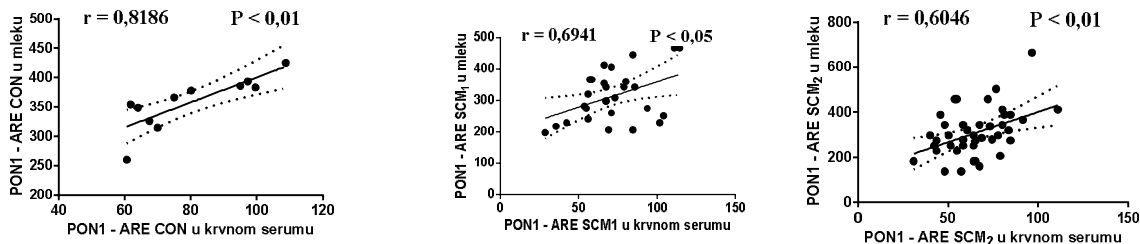


Grafikon 23. Korelacija PON1-ARE i LOOH u krvnom serumu (A) i mlečnom serumu (B). CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM_1 grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM_2 grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). Statistička značajnost $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***)

5.9.7. Analiza korelacione aktivnosti PON1-ARE u krvnom serumu i aktivnosti PON1-ARE u mlečnom serumu

Na grafikonu 24 prikazana je pozitivna korelacija utvrđena između aktivnosti PON1-ARE u krvnom serumu i aktivnosti ovog enzima u mlečnom serumu, i to veoma jaka u kontrolnoj

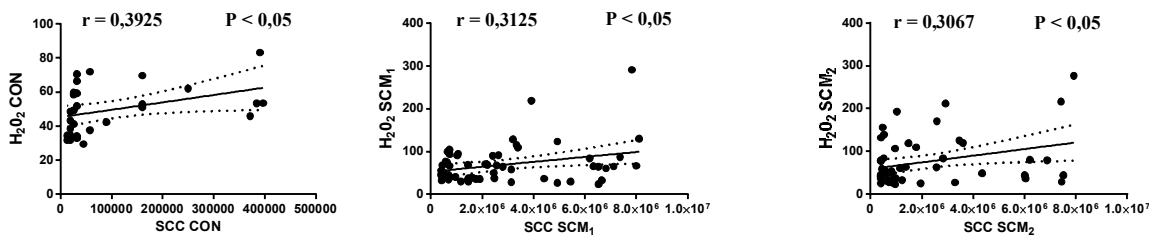
grupi ($r = 0,8186$; $P < 0,001$), i jaka u SCM_1 ($r = 0,6941$; $P < 0,001$) i SCM_2 grupi ($r = 0,6046$; $P < 0,001$).



Grafikon 24. Korelacija aktivnosti PON1 u krvnom i mlečnom serumu; CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM_1 grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM_2 grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). Statistička značajnost $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**).

5.9.8. Analiza korelacione povezanosti H_2O_2 i SCC

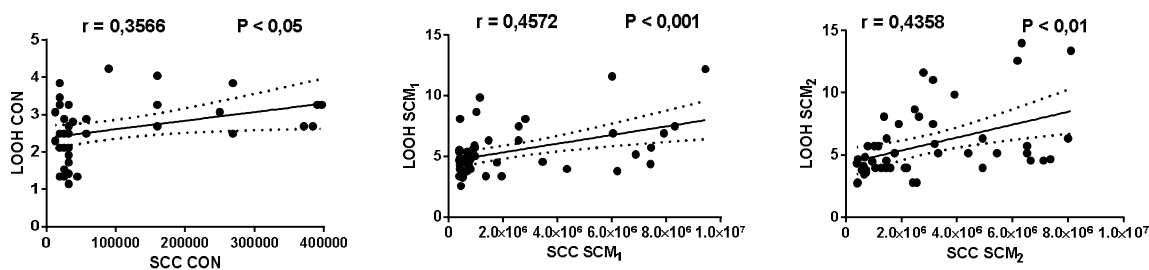
Korelacionom analizom između SCC u mleku i H_2O_2 u mlečnom serumu (grafikon 25) utvrđena je slaba pozitivna korelacija u svim ispitivanim grupama: CON ($r = 0,3925$), SCM_1 ($r = 0,3125$) i SCM_2 ($r = 0,3067$), na nivou statističke značajnosti $P < 0,05$.



Grafikon 25. Korelacija SCC i koncentracije H_2O_2 ; CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM_1 grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM_2 grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). Statistička značajnost $P < 0.05$ (*).

5.9.9. Analiza korelacije povezanosti LOOH i SCC

Rezultati korelacije analize između LOOH u krvnoj plazmi i SCC u mleku (grafikon 26) ukazali su na pozitivnu povezanost između ispitivanih parametara u grupama krava sa supkliničkim mastitisom i u kontrolnoj grupi.

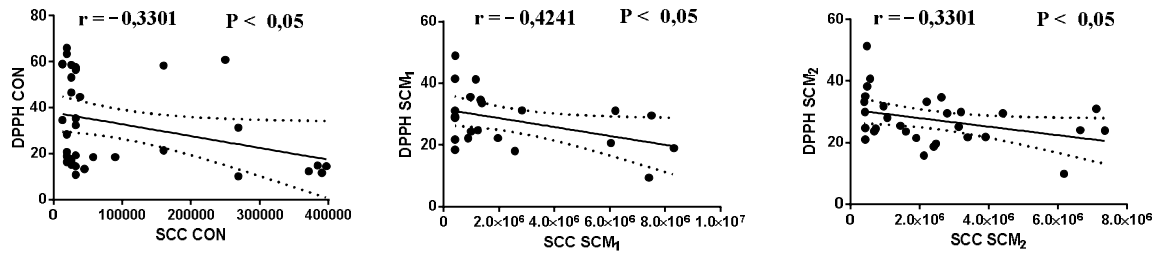


Grafikon 26. Korelacija SCC i LOOH; CON – kontrolna grupa krava, krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). Statistička značajnost $P < 0.05$ (*).

Slaba pozitivna korelacija utvrđena je kod kontrolne grupe krava ($r = 0,3566$; $P < 0,05$) i umerena pozitivna korelacija u SCM₁ ($r = 0,4572$; $P < 0,001$) i SCM₂ grupi ($r = 0,4358$; $P < 0,01$).

5.9.10. Analiza korelacije povezanosti DPPH i SCC

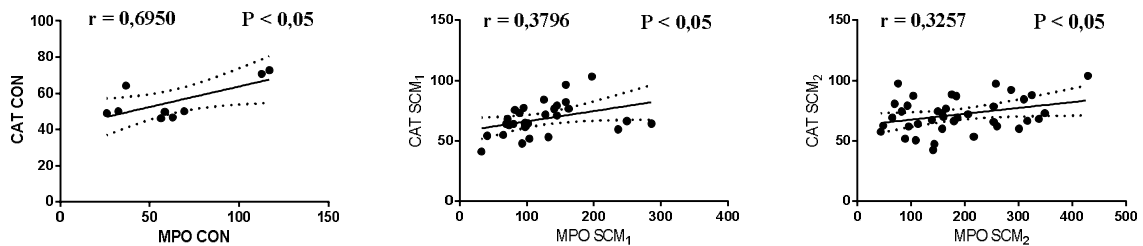
Rezultati korelacije analize između ukupnog antioksidativnog kapaciteta i SCC (grafikon 27) ukazali su na negativnu povezanost između ispitivanih parametara, na nivou statističke značajnosti $P < 0,05$ u grupama krava sa supkliničkim mastitisom i u kontrolnoj grupi. Slaba negativna korelacija utvrđena je kod kontrolne grupe krava ($r = - 0,3301$), umerena negativna korelacija u SCM₁ ($r = - 0,4241$) i slaba negativna korelacija u SCM₂ grupi ($r = - 0,3310$).



Grafikon 27. Korelacija SCC i ukupnog antioksidativnog kapaciteta preko DPPH; CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). Statistička značajnost $P < 0,05$ (*).

5.9.11. Analiza korelacione povezanosti aktivnosti enzima CAT i MPO

Pozitivna korelacija sa statističkom značajnošću $P < 0,05$ utvrđena je između aktivnosti enzima katalaze u eritrocitima i mijeloperoksidaze u krvnom serumu u svim ispitivanim grupama. Rezultati ove korelacione analize su prikazani na grafikonu 28. Jaka pozitivna korelacija CAT i MPO utvrđena je u krvnom serumu kontrolne grupe krava ($r = 0,6950$; $P < 0,05$) i slaba pozitivna korelacija u SCM₁ ($r = 0,3796$; $P < 0,05$) i SCM₂ grupi ($r = 0,3257$; $P < 0,05$).

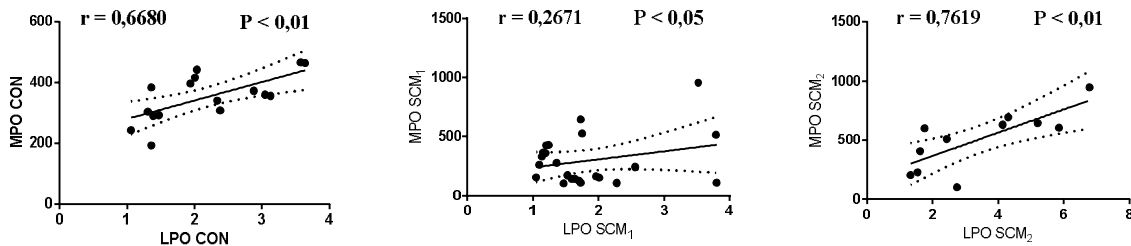


Grafikon 28. Korelacija između aktivnosti CAT i MPO; CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM₁ grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM₂ grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). Statistička značajnost $P < 0,05$ (*).

5.9.12. Analiza korelacione povezanosti enzima MPO i LPO

Rezultati korelacione analize između LPO i MPO u krvnom serumu su prikazani na grafikonu 29. Jaka pozitivna korelacija u krvnom serumu između MPO i LPO utvrđena je kod

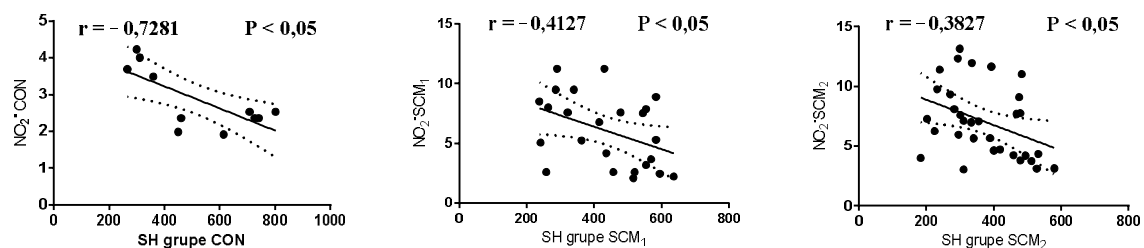
kontrolne grupe ($r = 0,6680$; $P < 0,01$) i kod SCM_2 grupe ($r = 0,7619$, $P < 0,01$), dok je slaba korelacija utvrđena kod SCM_1 grupe ($r = 0,2671$; $P < 0,05$).



Grafikon 29. Korelacija između aktivnosti MPO i LPO; CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM_1 grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM_2 grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). Statistička značajnost $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**).

5.9.13. Analiza korelacione povezanosti koncentracije NO_2^- i SH-grupa u krvnom serumu

Rezultati korelacione analize između koncentracije nitrita i SH-grupa (grafikon 30) ukazali su na postojanje inverzne korelacije između ispitivanih parametara u svim grupama ($P < 0,05$). Jaka negativna korelacija utvrđena je u kontrolnoj grupi krava ($r = -0,7281$, $P < 0,05$), umerena negativna korelacija u SCM_1 ($r = -0,4127$; $P < 0,05$) i slaba negativna korelacija u SCM_2 grupi ($r = -0,3827$; $P < 0,05$).



Grafikon 30. Korelacija između koncentracije nitrita i SH-grupa; CON – kontrolna grupa krava, krave sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*: SCM_1 grupa (< 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka), SCM_2 grupa (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka). Statistička značajnost $P < 0,05$ (*).

6. DISKUSIJA

Mastitisi su jedno od najvažnijih oboljenja mlečnih krava, iako su veoma aktuelna tema istraživanja, ovo oboljenje i dalje nanosi velike ekonomske gubitke govedarskoj proizvodnji širom sveta usled smanjene produkcije mleka, visokih troškova terapije, odbacivanja mleka zbog upotrebe antimikrobnih preparata i prevremenog izlučivanja životinja (Miller i sar., 1993; Chagunda i sar., 2006; Heikkilä i sar., 2012; Szweda i sar., 2014; Yang i Li, 2015; Taponen i sar., 2016). Iako je poznat veliki broj mogućih bakterijskih uzročnika mastitisa, jedan od najčešćih je *S. aureus*, koji dovodi do akutnih ili hroničnih formi mastitisa (Taponen i Pyorala, 2009; Ryman i sar., 2015; Ismail, 2017).

Mastitisi krava izazvani sa *S. aureus* najčešće su supkliničkog i hroničnog toka (Tiezzi i sar., 2015; Jørgensen i sar., 2016; Mir i sar., 2017), bez vidljivih promena mleka i mlečne žlezde, zbog čega su veoma teški za otkrivanje (Sharma i Jeong, 2013). Ovi mastitisi često ostaju nedijagnostikovani, i samim tim životinje ostaju nelečene duži vremenski period (Barlow i sar., 2013). *Staphylococcus aureus* čest je uzročnik supkliničkih mastitisa mlečnih krava, usled sposobnosti da izbegne urođeni i stečeni imunološki odgovor domaćina, kao i rezistencije na veliki broj antimikrobnih preparata (Bradley, 2002; Contreras i Rodriguez, 2011). Mastitisi izazvani sa *S. aureus* su veoma kontagiozni, mogu se veoma brzo proširiti tokom muže na druge četvrti vimena iste jedinke, kao i na druge krave, i imaju veoma nisku stopu izlečenja (Linder i sar., 2013).

U mlečnu žlezdu *S. aureus* dospeva preko sisnih kanala, umnožava se u cisterni, i adhezija za epitelne ćelije mlečne žlezde predstavlja važan korak u procesu infekcije (Deگو i sar., 2002). Prodor *S. aureus* kroz sisne kanale mlečne žlezde, povećana infiltracija neutrofila, povećano stvaranje ROS i antibakterijskih peptida značajno dovode do povećanja SCC u mleku, koje su nadalje glavni izvor ROS u borbi protiv bakterija. Iako su veoma značajni u borbi protiv patogenih mikroorganizama, povećana proizvodnja ROS dovodi do nastanka stanja poznatog kao oksidativni stres. Nastanak ROS obično je u početku samo lokalno, na mestu oštećenja ili infekcije tkiva, ali ukoliko inflamatorni odgovor nije pod kontrolom, stanje oksidativnog stresa prelazi u hronični oblik, dovodeći do sistemskih promena u organizmu (Gabai i sar., 2019). Prisustvo patogenih mikroorganizama u mlečnoj žlezdi dodatno povećava stvaranje SR. Tokom odbrambene reakcije mlečne žlezde od patogena, može doći i do oksidativne modifikacije

različitih biomolekula i oštećenja lokalnog tkiva, što dovodi do intenziviranja zapaljenja i oštećenja ćelija i tkiva vimena.

Razumevanje patogeneze mastitisa ključno je za razvoj rane dijagnostike mastitisa u supkliničkoj fazi, kako bi se blagovremeno započela terapija i smanjili ekonomski gubici. Otkrivanje mastitisa u što ranijem stadijumu bolesti je veoma važno kako bi se sprečilo širenje infekcije na druge četvrti vimena iste životinje, kao i na druge životinje, i kako bi se proizvodilo mleko neškodljivo za ljudsko zdravlje.

Merenje adekvatnog biomarkera oksidativnog stresa kod mlečnih krava moglo bi ukazati ne samo na ranu pojavu bolesti, njenu progresiju i procenu efikasnosti terapije, već pomoći i u rasvetljavanju patofizioloških mehanizama oštećenja tkiva dejstvom oksidativnog stresa, u predikciji prognoze bolesti i izboru adekvatnog lečenja u ranim stadijumima bolesti.

6.1. Uticaj SCM izazvanih *S. aureus* na lipidni status krava

Metabolizam mlečnih krava opterećen je visokom proizvodnjom mleka, kratkim periodima zasušenja i čestim telenjima. Kod mlečnih krava, naročito tokom tranzicionog perioda menja se metabolizam lipida kako bi se zadovoljile povećane potrebe za energijom (Grummer, 1993; Turk i sar., 2013). Lipidi su u organizmu značajan izvor energije, sastavni su deo ćelijskih membrana i imaju značajnu ulogu u ćelijskoj signalizaciji. Kod krava najzastupljeniji lipoprotein je HDL, čineći više od 80% ukupnih lipoproteina (Gardner i sar., 2003).

Poznato je da HDL ima značajnu antioksidativnu i antiinflamatornu ulogu, doprinoseći nespecifičnoj odbrani organizma (Haraguchi i sar., 2014). S obzirom na to da sadrži veliki broj lipidnih i proteinskih komponenti, HDL lipoprotein je dobar biološki potencijal. Naime, mnoge supstance vezane za HDL česticu, biološki su aktivne. Antioksidativna i antiinflamatorna uloga HDL posredovana je preko nekoliko strukturalnih proteina i enzima koji su vezani za HDL, uključujući PON1 (Miyamoto i sar., 2005; Gugliucci i sar., 2013), apoA-I, faktor aktivacije trombocita (*eng.* platelet activating factor - PAF) i haptoglobin (Link i sar., 2007). Ispitivanja su potvrdila inhibitorno dejstvo HDL na migraciju monocita indukovanu oksidovanim LDL (Fan i Watanabe, 2003), atheziju monocita za endotelne ćelije (Barter i sar., 2004) i citotoksičnost prouzrokovanu LDL oksidovanom česticom (Mertens i sar., 2003).

U našem istraživanju, promene u metabolizmu lipida, i u serumskom lipidnom profilu utvrđene su kod krava sa supkliničkim mastitisom. Značajno niže koncentracije HDL utvrđene su u SCM₂ grupi u poređenju sa SCM₁ grupom, i zdravim kravama. Niže koncentracije HDL utvrđene kod krava sa supkliničkim mastitisom najverovatnije su posledica smanjene sekrecije apoA, osnovnog proteina za sintezu HDL, čija se sinteza smanjuje usled inflamacije (Kato, 2002; Bionaz i sar., 2007), pa samim tim i niže koncentracije HDL su prouzrokovane inflamatornim stanjem. Podaci iz literature ukazuju da je tokom inflamacije smanjena koncentracija apoA-I, PON1 i PAF, dok je značajno povišena koncentracija SAA i sekretorne fosfolipaze-A2 vezanih za HDL (Smith, 2010; De la Llera Moya i sar., 2012). Usled navedenih promena, značajno se smanjuju i antioksidativna svojstva HDL čestice (Feingold i sar., 1998; Pirillo i sar., 2015). Utvrđeno je da i endotoksemija dovodi do remodeliranja HDL čestice, usled povećane aktivnosti endotelijalnih lipaza (Badellino i sar., 2008), i smanjenih aktivnosti lecitin-holesterol-aciltransferaze (Wendel i sar., 2007; De la Llera Moya i sar., 2012). Sve ove promene rezultiraju nižim koncentracijama i gubitkom funkcionalnih svojstava HDL tokom inflamatornih stanja (De la Llera Moya i sar., 2012; McGillicuddy i sar., 2009), što je u skladu sa našim rezultatima, i utvrđenim nižim koncentracijama HDL tokom supkliničkih mastitisa. Niže koncentracije HDL utvrđene su u našem istraživanju u grupi krava sa ≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka, u poređenju sa grupom krava koja je imala < 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka, kao i u poređenju sa kontrolnom grupom, na osnovu čega možemo zaključiti da na koncentraciju HDL ima uticaja broj *S. aureus* u mleku, odnosno, intenzitet infekcije.

U literaturi postoje podaci koji ukazuju na promene u koncentraciji HDL kod krava i u fiziološkim stanjima. Turk i sar. (2008) su utvrdili znatno niže koncentracije HDL u periodu zasušenja u poređenju sa prvim i drugim trimestrom graviditeta, i značajno više koncentracije u sredini laktacije, u poređenju sa ranim i kasnim puerperijumom. Kasnijim istraživanjima, utvrđeno je i da je koncentracija HDL duplo niža na dan telenja u poređenju sa vrednostima izmerenim 60 dana od telenja (Turk i sar., 2016).

U našem istraživanju je dokazano da supklinička inflamacija mlečne žlezde remeti metabolizam lipida utičući i na koncentracije LDL. Utvrđene su značajno više koncentracije LDL kod krava sa supkliničkim mastitisom, nezavisno od broja *S. aureus* u mleku, u poređenju sa zdravim kravama. U literaturi postoje podaci koji ukazuju na povišene koncentracije LDL kod krava i u drugim patološkim stanjima, kao što je masna jetra (Farid i sar., 2013).

Naše istraživanje je pokazalo da se tokom supkliničke inflamacija vimena, ne menja koncentracija TC i TG, što je u skladu sa istraživanjem Turk i sar. (2012). Podaci iz literature pokazuju da su koncentracije TC snižene nakon telenja, sa utvrđenim minimalnim vrednostima trećeg dana nakon telenja (Bernabucci i sar., 2004). U literaturi postoje podaci da su nakon telenja kod krava snižene koncentracije TG (Turk i sar., 2004), što može biti povezano sa povećanom aktivnošću lipoprotein-lipaze (Van den Top i sar., 2005), usled povećanih energetske zahteva za transfer masti u mlečnu žlezdu radi proizvodnje mleka (Fiore i sar., 2014).

U humanoj medicini postoje studije koje ukazuju da tokom infekcije postoje značajne promene u metabolizmu lipida, pri čemu se povećava koncentracija TG i VLDL. Do povećanja koncentracije TG dolazi usled smanjene hidrolize TG, povećane sinteze masnih kiselina indukovane proinflamatornim citokinima, povećane sinteze TG u jetri i smanjenje aktivnosti lipoprotein-lipaze (Wendel i sar., 2007).

6.2. Uticaj SCM izazvanih *S. aureus* na stvaranje ROS

U borbi protiv *S. aureus* u stimulisanim fagocitima dolazi do niza reakcija, poznatih kao oksidativni prasak (De Coursey i Ligeti, 2005), pri čemu nastaje nekoliko veoma reaktivnih međuproizvoda: $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet HO$, 1O_2 i $HOCl$ (Winterbourn i sar., 2016). Nastali proizvodi oksidacije doprinose liziranju bakterijskih ćelija, uz veliki utrošak kiseonika. Oni modifikuju i inaktiviraju makromolekule bakterijske ćelije, što za posledicu ima sprečen rast ili smrt bakterija (Beavers i Skaar, 2016).

Vodonik-peroksid je najstabilniji intermedijarni produkt redukcije kiseonika. U niskim koncentracijama H_2O_2 stvaraju svi aerobni mikroorganizmi (Juven i Pierson, 1996). U mleku H_2O_2 neprestano nastaje u epitelnim ćelijama i leukocitima mleka (Silanikove i sar., 2014). Pri fiziološkim uslovima, H_2O_2 nastao u peroksizomima ćelija razlaže enzim CAT do vode i kiseonika, i na taj način smanjuje njegovu toksičnost. Iako ima slaba oksidujuća i redukujuća svojstva, H_2O_2 veoma lako difunduje kroz ćelijsku membranu (Al-Gubory i sar., 2010), gde u prisustvu jona metala i $O_2^{\bullet-}$ može nastati visoko reaktivni $\bullet HO$ (Juven i Pierson, 1996; Villamena, 2013; Hayyan i sar., 2016). Baktericidno dejstvo H_2O_2 na *S. aureus* proizilazi upravo iz nastanka toksičnijeg $\bullet HO$. Takođe, brojne peroksidaze, kao što su MPO, EPO i LPO, koriste

H₂O₂ kao supstrat (Sies, 2017), pri čemu se H₂O₂ u prisustvu unutarćelijskih jona halogena prevodi u baktericidne materije: HClO i hipohalogeni-radikal.

Značajno više koncentracije H₂O₂ utvrđene su u krvnom serumu kod krava sa većim brojem *S. aureus* (≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka, SCM₂ grupa), u poređenju sa zdravim kravama, što ukazuje na povećano stvaranje ROS u organizmu, zavisno od broja patogenog uzročnika. Iako je nastanak ROS obično u početku samo lokalno, na mestu oštećenja ili infekcije tkiva, ukoliko inflamatorni odgovor nije pod kontrolom, stanje oksidativnog stresa prelazi u hronični oblik, dovodeći do sistemskih promena u organizmu (Gabai i sar., 2019), što je potvrđeno u našem istraživanju višim koncentracijama H₂O₂ u krvnom serumu SCM₂ grupe krava. Prema literaturnim podacima koncentracija H₂O₂ u krvi ljudi je 1-5 μ M (Forman i sar., 2016), što je znatno niže od koncentracija H₂O₂ u krvnom serumu goveda zabeleženih u našem radu.

U našem istraživanju u mlečnom serumu su utvrđene više koncentracije H₂O₂ u obe grupe krava sa SCM, potvrđujući da povećan SCC i prisustvo patogenih mikroorganizama u mlečnoj žlezdi značajno povećava stvaranje SR. Niže koncentracije H₂O₂ utvrđene u grupi krava sa ≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL, mogle bi se objasniti činjenicom da i sam *S. aureus* poseduje enzim CAT koja prevodi H₂O₂ do H₂O i O₂ (Cosgrove i sar., 2007).

Veza između povećanog nastanka SR i povećanja SCC, od kojih pri supkliničkim mastitisima procenat PMN prelazi i 90% (Zecconi i sar., 1994; Prin-Mathieu i sar., 2002) potvrđena je pozitivnom korelacijom sa statističkom značajnošću između H₂O₂ i SCC u svim grupama ispitivanih krava. Iako je analizom korelacione povezanosti utvrđeno da je ova veza slabo pozitivna ($r = 0,3924$ u CON; $r = 0,3125$ u SCM₁ i $r = 0,3067$ u SCM₂), u svim ispitivanim grupama bila je sa statističkom značajnošću.

6.3. Uticaj SCM izazvanih *S. aureus* na aktivnost antioksidativnih enzima

U normalnim, fiziološkim uslovima, antioksidativni sistem ćelije, koji čini grupa enzima i neenzimskih komponenti, efikasno snižava nivo ROS na fiziološki prihvatljiv nivo, koji ne ugrožava funkcije ćelije. Međutim, u inflamatornim oboljenjima, kao što je mastitis, ovaj sistem je narušen i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite su izmenjene i može doći do pojave

oksidativnog oštećenja u ćelijama usled povišenog nivoa oksidativnog stresa (Yang i Li, 2015; Sharma i sar., 2016).

Prvu liniju odbrane od ROS predstavlja enzim SOD koja ima značajnu ulogu u zaštiti ćelija od oksidativnih oštećenja. Superoksid-dismutaza prevodi visoko reaktivni superoksidni-anjon do H_2O_2 i molekuskog kiseonika. Dalju neutralizaciju nastalog H_2O_2 vrše enzimi CAT i glutation-peroksidaza.

Prema Hoolbrook i Hicks (1978) aktivnost SOD u mleku krava varira u zavisnosti od rase, i kod krava Holštajn rase iznosi 0,92 U/mL, a kod rase Džersezj 1,27 U/mL. Na aktivnost SOD u mleku krava nema uticaja stadijum laktacije, starost krava, vreme muže, kao ni SCC (Hicks, 1980; Lindmark-Månsson i Åkesson, 2000; Przybylska i sar., 2007). Aktivnost SOD u mleku je približno 100 puta niža nego u krvi goveda (Hoolbrook i Hicks, 1978). U humanom mleku aktivnost SOD je 2,0 do 2,3 puta viša nego u mleku kod krava (Kiyosawa i sar., 1993).

U našem istraživanju utvrđena je inhibicija aktivnosti SOD u eritrocitima krava sa supkliničkim masitisom, od 13,42% u SCM_1 i 14,40% u SCM_2 grupi, ali bez statistički značajne razlike u poređenju sa zdravim kravama, što je u skladu sa istraživanjem Andrei i sar. (2010), i Zigo i sar. (2019).

Međutim, u mleku je naše ispitivanje ukazalo da supklinički mastitis dovodi do značajnog sniženja aktivnosti SOD, od 36,98% SCM_1 i od 48,89% u SCM_2 grupi, u poređenju sa aktivnošću u mlečnom serumu kontrolne grupe. Inhibicija aktivnosti SOD najverovatnije je usled povećanog stvaranja SR od strane PMN u mleku, koji dovode do oksidativnih modifikacija samog enzima. U literaturi postoje podaci koji ukazuju da se aktivnost SOD u mleku ne razlikuje značajno kod krava sa supkliničkim masitisom u poređenju sa zdravim kravama (Andrei i sar., 2010).

Dalje razlaganje neradikalskog H_2O_2 do H_2O katalizuje antioksidativni enzim CAT, sprečavajući tako njegovu difuziju u druge delove ćelije. Značajno viša aktivnost CAT u eritrocitima utvrđena je kod obe grupe krava sa SCM, viša od 40%, u poređenju sa kontrolnim kravama. Dobijene aktivnosti su bile približno iste u obe grupe krava sa supkliničkim masitisom, ukazujući da se aktivnost enzima katalaze povećava usled infekcije mlečne žlezde sa *S. aureus*, nezavisno od broja patogenog uzročnika. Povišena aktivnost CAT u vezi je sa povećanim potrebama za ovim enzimom kao jednim od zaštitnih mehanizama od oksidativnog stresa. Usled povećane inflamacije stvaranje H_2O_2 u ćelijama je povećano, pa se shodno tome povećava i

aktivnost katalaze. U literaturi postoje podaci koji ukazuju na značajno sniženje aktivnosti CAT u eritrocitima kod krava sa supkliničkim i kliničkim mastitisom (Mir i sar., 2017).

U mlečnom serumu, naše istraživanje je dokazalo značajno više aktivnosti CAT od 2,04 puta u SCM₁, i od 3,60 puta u SCM₂ grupi u poređenju sa aktivnošću u mlečnom serumu zdravih krava. U skladu sa našim rezultatima su ispitivanja brojnih autora (Silanikove i sar., 2005; Fox i Kelly, 2006; Andrei i sar., 2010) koji su ustanovili značajno višu aktivnost CAT kod krava sa supkliničkim mastitisom, smatrajući ovaj enzim indikatorom bakterijske infekcije vimena. Povišena aktivnost CAT u mleku može biti posledica i prisustva *S. aureus*, koji i sam produkuje ovaj enzim, što je u našem istraživanju potvrđeno nalazom viših aktivnosti CAT u mlečnom serumu grupe krava sa većim brojem stafilocoka, u poređenju sa grupom sa manjim brojem *S. aureus*. U literaturi, međutim, postoje podaci o značajnom sniženju aktivnosti CAT kod kliničkih mastitisa (Jhamb i sar. 2013) i supkliničkih mastitisa izazvanih *S. aureus* (Mir i sar., 2017).

6.4. Uticaj SCM izazvanih sa *S. aureus* na aktivnost paraoksonaza

Paraoksonaza 1 je antioksidativni i antiinflamatorni enzim sisara koji se uglavnom sintetiše u jetri odakle se otpušta u krv (Mackness i sar., 1996; Silveira i sar., 2019). Paraoksonaza 1 ima značajnu ulogu u metabolizmu lipida, jer hidrolizuje oksidovane lipide formirane na lipoproteinima (HDL i LDL) u obliku lipidnih hidroperoksida, i tako štiti od nastanka i razvoja oksidativnog stresa (Aviram i Vaya, 2013; Ceron i sar., 2014). Za merenje aktivnosti PON1 u našem eksperimentu, koristili smo paraokson i fenil-acetat, ispitujući tako paraoksonaznu i arilesteraznu aktivnost ovog enzima.

Inhibicija paraoksonazne aktivnosti PON1 u krvnom serumu u našem istraživanju utvrđena je u grupi krava sa većim brojem stafilocoka u mleku, dok je inhibicija aktivnosti PON1-ARE, utvrđena u obe grupa krava sa SCM u poređenju sa kontrolnom grupom.

Razlog inhibicije aktivnosti PON1 verovatno leži u činjenici da je aktivnost PON1 osetljiva na inflamaciju, i prema nekim autorima, ovaj enzim se može smatrati negativnim proteinom akutne faze, čija je serumska aktivnost i koncentracija smanjena tokom infekcije (Cabana i sar., 2003; James i Deakin, 2004; Bionaz i sar., 2007; Tecles i sar., 2015; Campos i sar., 2017; Silveira i sar., 2019). Literaturni podaci ukazuju na inhibiciju aktivnosti PON1 i u drugim patološkim stanjima kod krava, kao što su masna jetra (Farid i sar., 2013), ketoza (Cao i

sar., 2017), rane postpartalne infekcije uterusa (Schneider i sar., 2013) i mastitisi (Turk i sar., 2012).

Snižena aktivnost PON1 može, pored toga, biti i posledica povećane lipidne peroksidacije (Jaouad i sar., 2003), što može dovesti i do potpune inaktivacije enzima (Aviram i sar., 1999). U tranzicionom periodu kod mlečnih krava, kada je povećan nastanak ROS (Bionaz i sar., 2007), utvrđene su snižene aktivnosti PON1 (Turk i sar., 2013; Mayasari i sar., 2017). Inhibicija aktivnosti PON1-ARE kao posledica lipidne peroksidacije, potvrđena je u našoj studiji jakom negativnom korelacijom u krvnom serumu, i veoma jakom negativnom korelacijom u mlečnom serumu između aktivnosti PON1-ARE i koncentracije sekundarnih produkata lipidne peroksidacije, LOOH.

Uzimajući u obzir da je većina PON1 u krvi vezana za HDL čestice veoma značajno je i određivanje međusobne povezanosti ovih parametara. U našem istraživanju utvrđena je pozitivna korelacija sa statističkom značajnošću između PON1-ARE i HDL. Pozitivna korelacija između navedenih parametara opisana je i u tranzicionom periodu krava (Turk i sar., 2008) i junica (Turk i sar., 2013). U literaturi, takođe, postoje podaci da aktivnost PON1 u serumu krava nije u korelaciji sa koncentracijom HDL (Bionaz i sar., 2007; Antončić-Svetina i sar., 2011). U našem istraživanju utvrđena je i pozitivna korelacija između PON1 i TC, dok je negativna korelacija sa statističkom značajnošću utvrđena između PON1 i LDL, ukazujući na povezanost lipidnog statusa i aktivnosti ovog enzima.

Pozitivna korelacija sa statističkom značajnošću utvrđena u svim ispitivanim grupama između paraoksonazne i arilesterazne aktivnosti PON1, ukazuje na manji uticaj polimorfizma ovog enzima kod goveda. Naši rezultati su u saglasnosti sa nalazom Farid i sar. (2013), koji su ukazali na slične dijagnostičke performanse između dihidrokumarina, fenil-acetata i paraoksona za dijagnostikovanje masne jetre kod krava. Poznato je da je paraokson veoma nestabilan i izuzetno toksičan (Camps i sar., 2009), i može dovesti do teških organofosfatnih trovanje (Mogarekar i Chawhan, 2013). Smatra se da je fenil-acetat manje toksičan od paraoksona, i bezbedniji za rad analitičara u laboratoriji (Camps i sar., 2009). Zbog utvrđenog manjeg uticaja polimorfizma enzima prema različitim supstratima, logično bi bilo da se kod goveda upotrebljava supstrat koji je manje toksičan, jeftiniji i prilagođen analitičkim instrumentima i stanjem u laboratoriji.

Tokom naše studije utvrđena je značajna inhibicija aktivnosti PON1-ARE u mlečnom serumu, a prema nama dostupnim literaturnim podacima, ovo su prva ispitivanja aktivnosti paraoksonaza u mleku (Nedić i sar., 2019).

Jaka pozitivna korelacija sa statističkom značajnošću utvrđena u našem istraživanju između aktivnosti PON1-ARE u krvi i aktivnosti PON1-ARE u mlečnom serumu, i niže aktivnosti PON1-ARE za oko 200 puta u mlečnom u poređenju sa aktivnošću u krvnom serumu, ukazuju da je poreklo ovog enzima u mleku najverovatnije iz krvnog seruma. U literaturi postoje podaci koji ukazuju na korelaciju aktivnosti PON1 u krvnom serumu sa aktivnošću ovog enzima u drugim telesnim tečnostima, kao što je tečnost folikula, što je dokazano jakom pozitivnom korelacijom između serumske i intrafolikularne aktivnosti PON1 kod ljudi (Browne i sar., 2008), ovaca (Pradieé i sar., 2017) i krava (Campos i sar., 2017).

6.5. Uticaj SCM izazvanih *S. aureus* na ukupan antioksidativni kapacitet

Kao odgovor na povećanu produkciju SR, u isto vreme dolazi i do aktiviranja zaštitnih antioksidativnih mehanizama odbrane (Beattie i sar., 2006). Ukupan antioksidativni kapacitet odražava koncentraciju i aktivnost brojnih komponenti koja preveniraju oksidativna oštećenja, kao i odnos prooksidanasa i antioksidanasa u plazmi i drugim telesnim tečnostima (Ghiselli i sar., 2000). Kada se govori o antioksidativnim osobinama mleka koje je nezamenjiva hrana za rast i razvoj mladunčadi, značajan izvor energije i nutritivnih komponenti za sisare (Yilmaz-Ersan i sar., 2018), poznato je da ono sadrži različite makro- i mikronutrijente sa antioksidativnom aktivnošću. Antioksidativnu aktivnost u mleku imaju proteini kao što su kazein, β -laktoglobulini, α -laktoalbumini, imunoglobulini, laktoferin i albumini (Lindmark-Månsson i Akesson, 2000; Virtanen i sar., 2007). U mleku su prisutni i brojni antioksidativni enzimi, CAT, SOD, glutation-peroksidaza i laktoperoksidaze (Fox i Kelly, 2006; Silanikove i sar., 2014). Oni imaju značajnu ulogu u sprečavanju lipidne peroksidacije i samim tim u očuvanju kvaliteta mleka (Lindmark-Månsson i Akesson, 2000).

Smatra se da je efikasnost antioksidanasa različita u biološkim sistemima, pa je poželjno za određivanje TAC u uzorcima koristiti različite metode zasnovane na različitim principima (Yimaz-Ersan i sar., 2018). Postoje brojne metode za merenje antioksidativne sposobnosti i

procenu efikasnosti neutralizacije SR, a u ovoj studiji su korišteni DPPH i ABTS test , kao jednostavne metode, visoke osetljivosti i reproducibilnosti.

U našem istraživanju utvrđene su značajno niže koncentracije TAC u krvnom serumu krava sa SCM, u poređenju sa zdravim kravama. Naši rezultati su u saglasnosti sa nalazima drugih autora (Goff i sar., 1996; Komine i sar., 2004; Weiss i sar., 2004), ukazujući na iscrpljenost antioksidativnog odbrambenog sistema tokom SCM. Podaci iz literature ukazuju da su tokom tranzicionog perioda krave podložne oksidativnom stresu, što je potvrđeno povećanjem peroksidacije lipida i smanjenim ukupnim antioksidativnim kapacitetom (Bernabucci i sar., 2002; Castillo i sar., 2005; Castillo i sar., 2006; Sordillo i Aitken, 2009; Contreras i Sordillo, 2011; Osorio i sar., 2014; Abuelo i sar., 2015).

U našim istraživanjima, dokazano je da kao posledica supkliničkih mastitisa krava izazvanih sa *S. aureus* dolazi do značajne redukcije koncentracije TAC u mleku krava sa SCM, u poređenju sa mlekom zdravih krava. U skladu sa našim rezultatima je i ispitivanje Andrei i sar. (2016), koji su dokazali značajno sniženje TAC u mleku krava sa povećanim SCC.

Negativna korelacija sa statističkom značajnošću, utvrđena između TAC i SCC u našem istraživanju, u saglasnosti je sa rezultatima Atakisi i sar. (2010) kod krava i Silanikove i sar. (2014) kod koza. Dobijeni rezultati ukazuju na direktnu povezanost antioksidativnog statusa i težine infekcije utvrđene preko broja somatskih ćelija prisutnih u mleku.

Snižene koncentracije TAC u krvnom i mlečnom serumu krava dokazane u našem radu, preko oba navedena testa, ukazuju da su kod krava sa supkliničkim mastitisom u poređenju sa zdravim kravama iscrpljeni antioksidativni odbrambeni mehanizmi kako u mlečnoj žlezdi, tako i sistemski u organizmu krava.

6.6. Analiza stepena lipidne peroksidacije i stepena hemolize eritrocita kod krava sa SCM izazvanim *S. aureus*

Lipidna peroksidacija je jedna od najčešćih posledica oksidativnog stresa u ćelijama. Oštećenje lipidnog dvosloja u ćelijama dovodi do gubitka integriteta ćelijske membrane, inaktivacije proteina u membrani, aktivnosti membranski vezanih enzima, gubitka membranskog potencijala, i izmenjene funkcije važnih signalnih puteva koji su u vezi sa ćelijskom membranom

(Valko i sar., 2007). Oksidacija lipida mlečne masti dejstvom ROS predstavlja ozbiljan problem u mlečnoj industriji (Lindmark-Månson i Akesson, 2000; Al-Mabruk i sar., 2004), naročito kod supkliničkih mastitisa koji često ostaju ne prepoznati.

Stepen lipidne peroksidacije kod krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus* u našem istraživanju, praćen je preko koncentracije MDA i koncentracije LOOH. Malondialdehid, jedan od krajnjih proizvoda lipidne peroksidacije, smatra se pouzdanim indikatorom oksidativnog stresa (Esterbauer i sar., 1991; Del Rio i sar., 2005), i oštećenja ćelijskih membrana (Ranjan i sar., 2005).

U našem istraživanju utvrđene su značajno više koncentracije MDA u eritrocitima krava SCM₂ grupe, u poređenju sa kontrolnom grupom, ukazujući na veći stepen oštećenja ćelijske membrane kod grupe krava sa većim brojem *S. aureus*. Više koncentracije MDA utvrđene su i u eritrocitima krava SCM₁ grupe krava u poređenju sa kontrolnom grupom, ali ovo povećanje je bilo bez statističke značajnosti. Promene u koncentraciji MDA kod supkliničkih mastitisa, koje su u saglasnosti sa našim ispitivanjem, dokazali su Sadek i sar. (2017) i Leishangthem i sar. (2018). Podaci iz literature pokazuju da je koncentracija MDA u eritrocitima značajno povišena kod krava sa kliničkim mastitisom (Ranjan i sar., 2005; Mir i sar., 2017).

U našem istraživanju utvrđene su značajno više koncentracije MDA u mlečnom serumu kod obe grupe krava sa SCM u poređenju sa zdravim kravama. Međusobnim poređenjem koncentracije MDA u mlečnom serumu krava sa supkliničkim mastitisom, utvrđene su više vrednosti u SCM₂ grupi, ukazujući da je viši nivo lipidne peroksidacije prisutan u mleku sa većim brojem *S. aureus*. Do rezultata sličnih našim došli su i autori koji su utvrdili znatno više koncentracije MDA u mleku krava sa kliničkim mastitisom (Sharma i sar., 2016; Mir i sar., 2017) i supkliničkim mastitisom (Andrei i sar., 2010; Andrei i sar. 2016; Sharma i sar., 2016; Mir i sar., 2017) u poređenju sa mlekom zdravih krava.

Pored koncentracije MDA pratili smo da li postoje razlike u koncentraciji LOOH kod krava sa supkliničkim mastitisom, u odnosu na zdrave jединke. Lipidni hidroperoksidi, sekundarni proizvodi lipidne peroksidacije (Castillo i sar., 2003) su nestabilni, lako se razlažu i formiraju veoma reaktivna aldehidna jedinjenja, koja su znatno stabilnija od ROS i lako difunduju u ćeliju. Podaci iz literature ukazuju da je tokom laktacije, usled povećane metaboličke aktivnosti u epitelijalnim ćelijama mlečne žlezde povećan nastanak ROS i LOOH (Jin i sar.,

2014). Povećanje koncentracije LOOH izraženije je kod krava sa visokom proizvodnjom mleka (Castillo i sar., 2003).

Značajno više koncentracije LOOH u našem istraživanju utvrđene su kod grupa krava sa supkliničkim mastitisom (SCM₁ i SCM₂) u odnosu na koncentracije zabeležene kod kontrolnih krava i u krvnom, i u mlečnom serumu.

Veće koncentracije proizvoda lipidne peroksidacije praćenih preko koncentracije MDA i LOOH u našem istraživanju, ukazuju na to da kod krava sa supkliničkim mastitisom postoji veći stepen lipidne peroksidacije i oštećenja ćelijske membrane. Povećanje lipidne peroksidacije kod krava sa supkliničkim mastitisom, posledica je povećanog stvaranja ROS od strane neutrofila u inficiranoj mlečnoj žlezdi, koji posledično dovode do peroksidativnih oštećenja ćelija mlečne žlezde (Boulanger i sar., 2002). Usled povećanja broja PMN u mleku, koji čine najveći procenat SCC u mleku krava sa supkliničkim mastitisom, povećava se stvaranje SR koji sa jedne strane dovode do uništavanja patogenih mikroorganizama, a sa druge do oksidacije lipida, pri čemu se povećava koncentracija MDA i LOOH.

Da usled povećanja SCC dolazi do većeg stepena oksidacije lipida, potvrđuje pozitivna korelacijom SCC i LOOH utvrđena u svim grupama krava u našem istraživanju, sa statističkom značajnošću.

Osmotska fragilnost eritrocita

Oksidacija polinezasićenih masnih kiselina izazvana sa ROS dovodi do povećane propustljivosti ćelijske membrane, ali i težih posledica kao što je liziranje eritrocita i izlazak hemoglobina. Eritrociti se smatraju potencijalnim metama prooksidanasa zbog činjenice da je njihova membrana bogata polinezasićenim masnim kiselinama, i veoma su osetljivi na oksidativna oštećenja (Hanzawa i Watanabe, 2000). Zbog toga, kao i zbog činjenice da su eritrociti najbrojnije ćelije krvne loze, veoma često se u istraživanjima koriste kao model biološke membrane (Olaifa i sar., 2012).

Dokazana povećana osmotska fragilnost eritrocita u našem istraživanju kod krava sa supkliničkim mastitisom, može biti povezana sa povećanom lipidnom peroksidacijom prouzrokovanom prekomernim nastankom i nakupljanjem ROS. Povišena osmotska fragilnost eritrocita zabeležena je kod goveda, konja i koza usled stresa izazvanog transportom životinja

(Fazio i sar., 2016). Prema nama dostupnim literaturnim podacima, ovo su prva ispitivanja osmotske fragilnosti eritrocita kod krava sa supkliničkim mastitisom.

6.7. Analiza indikatora oštećenja proteina kod krava sa SCM izazvanim *S. aureus*

Proteini predstavljaju značajne ciljne molekule za SR zbog visoke zastupljenosti u strukturama bioloških sistema i zbog uključenosti u većinu funkcionalnih procesa unutar ćelija (Dalle-Donne i sar., 2006). Ukoliko dođe do oksidacije proteina, gubi se njihova aktivnost, podložniji su proteolizi i precipitaciji (Shacter, 2000). Oksidovani proteinski produkti mogu pokrenuti imunu reakciju i stvaranje autoantitela (Celi i Gabai, 2015).

U poređenju sa mlekom iz četvrti zdravog vimena, kod inflamacije mlečne žlezde iako se ne menja značajno ukupan sadržaj proteina, proteinski sastav mleka se znatno menja, smanjuje se koncentracija kazeina, dok se usled propustljivosti krvnih sudova povećava koncentracija albumina, imunoglobulina i transferina (Turk i sar., 2012).

Osim enzima antioksidativne zaštite, antioksidativnom kapacitetu ćelija i organizma, doprinose i neenzimski antioksidansi u koje spadaju i SH-grupe proteina. One su važni endogeni antioksidansi, jer prve podležu oksidaciji u ćelijama, tako štiteći enzime i proteine od oksidativnih modifikacija (Islamov i sar., 2002). Kao odgovor na oksidativni stres, dolazi do promene u koncentracijama slobodnih tiolnih grupa, pa određivanje njihove koncentracije može dati značajne podatke o oksidativnim promenama proteina, i značajan su biomarker oksidativnog stresa (Baba i Bhatnagar, 2018).

U našem istraživanju, utvrđene su niže koncentracije SH-grupa u krvnoj plazmi SCM₂ grupe u poređenju sa kontrolnom grupom. U mlečnom serumu utvrđene su niže koncentracije SH-grupa u SCM₁ i SCM₂ grupi krava, u poređenju sa kontrolnom grupom. Dobijeni rezultati ukazuju na povećanje nitrozativnog stresa kod krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus*. Niže koncentracije SH-grupa utvrđene u krvnoj plazmi i u mlečnom serumu grupe sa ≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL grupe u poređenju sa grupom kod koje je broj *S. aureus* u mleku bio ispod 1000 CFU/mL, ukazuju na veći stepen oksidativnih modifikacija proteina, u grupi sa većim brojem patogenog uzročnika u mleku inficirane četvrti. Podaci iz literature pokazuju da se koncentracija SH-grupa ne razlikuje između zdravih krava i krava sa mastitisom, ukoliko je u ishranu dodavan vitamin E (Politis i sar., 2012).

Prethodne studije su pokazale da je kod mastitisa krava povećana koncentracija nitrata i nitrita u plazmi, kao i da je stepen produkcije nitrita zavisan od težine inflamatornog procesa (Silanikove i sar., 2009). U visoko kvalitetnom mleku koncentracija nitrita su svega nekoliko μM (Silanikove., 2014),

Značajno više koncentracije nitrita utvrđene su u našoj studiji u krvnoj plazmi i mlečnom serumu kod krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus* u poređenju sa kontrolnom grupom. Ovo povećanje koncentracije nitrita bilo je za 2,21 puta više u krvnoj plazmi SCM₁ grupe i za 2,59 puta više u krvnoj plazmi SCM₂ grupe u poređenju sa vrednostima izmerenim kod kontrolne grupe. Relativno visoke koncentracije nitrita dokazane u našoj studiji ukazuju na oštećenja proteina, lokalno u mleku, ali i sistemski u organizmu. Dobijeni rezultati su u skladu sa studijom Silanikove i sar. (2009).

Visoke koncentracije nitrita zabeležene su i u mlečnom serumu kod krava sa supkliničkim mastitiom, u poređenju sa mlekom zdravih krava. Ovo povećanje koncentracije nitrita bilo je za 2,32 puta više u mlečnom serumu SCM₂ grupe odnosu na koncentracije mlečnom serumu kontrolne grupe. U skladu sa našim rezultatima su studije sa eksperimentalno izazvanim mastitisom krava. Tako su dokazane znatno povišene koncentracije nitrita u mleku, ukoliko je mastitis izazvan stafilokoknim enterotoksinom C (Komine i sar., 2004), bakterijom i endotoksinom *E. coli* (Blum i sar., 2000; Weiss i sar., 2004). U skladu sa našim istraživanjima, Silanikove i sar. (2012) utvrdili su više koncentracije nitrita u mleku krava kod mastitisa u poređenju sa koncentracijama u krvi, ukazujući na produkciju nitrita lokalno u mlečnoj žlezdi.

Oksidativni stres i oštećenja proteina nastala usled inflamacije i oksidativnog stresa, mogu se proceniti i određivanjem koncentracije AOPP (Hanasand i sar., 2012). Uznapredovali prizvodi oksidacije proteina prvi put su opisani kod pacijenata na dijalizi, kao marker oksidativnog stresa kod uremije (Witko-Sarsat, 1996). Prema Celi i sar. (2011) AOPP su marker oksidacije proteina nastale usled aktivacije neutrofila tokom zapaljenskog procesa. Pošto se smatra da su AOPP biomarker neutrofilnog ROS nastanka, specifičan proizvod oksidativnog praska neutrofila i HOCl (Bordignon i sar., 2014; Celi i Gabai, 2015; Gabai i sar., 2019), interesantno je bilo pratiti njihove koncentracije u krvnoj plazmi i mlečnom serumu kod krava sa supkliničkim mastitisom. Prema dostupnoj literaturi još uvek nema podataka o koncentracijama AOPP u krvi i mleku kod supkliničkih mastitisa krava.

U našem istraživanju utvrđene su značajno više koncentracije AOPP u krvnoj plazmi, kod krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim *S. aureus* u poređenju sa zdravim kravama.

Povećanju AOPP u plazmi može doprineti bilo koji protein podložan oksidativnoj modifikaciji. Smatra se da je kod goveda, goveđi serumski albumin predominantni protein sa antioksidativnim osobinama u plazmi goveda (Roche i sar., 2008, Celi i sar., 2011), i najpodložniji oksidativnim promenama pri čemu mogu nastati značajne koncentracije AOPP (Bordignon i sar., 2014). Celi i sar. (2011, 2012) su dokazali značajno povišene koncentracije AOPP i AOPP:albumin, kod krava sa kasnim uginućima embriona (24-48 dana nakon veštačkog osemenjavanja), predlažući AOPP indikatorom akutnog zapaljenskog procesa i oksidativnog stresa kod mlečnih krava. Nedavne studije su pokazale da je koncentracija AOPP povećana kod mlečnih krava koje su hranjenje kukuruznom silažom (Celi i Raadsma, 2010). Slično našim istraživanjima u kome su utvrđene povišene koncentracije AOPP pri supkliničkoj infekciji vimena, Gabai i sar. (2019) su pokazali da su koncentracije AOPP značajno povišene u plazmi krava sa endometritisom.

U našem istraživanju utvrđene su znatno više koncentracije AOPP i u mlečnom serumu krava sa SCM, u poređenju sa koncentracijama u mlečnom serumu kontrolne grupe. Nastanak AOPP u mlečnoj žlezdi je najverovatnije u vezi sa aktivacijom PMN leukocita (Shirai i sar., 2002; Bordignon i sar., 2014; Celi i Gabai, 2015) čija procentualna zastupljenost u mleku krava sa supkliničkim mastitisom prelazi i 90% u poređenju sa drugim SCC. Povišene koncentracije AOPP u mleku krava sa supkliničkim mastitisom rezultat su oštećenja proteina mleka, ali i proteina plazme čiji je prelazak u mlečnu žlezdu povećan usled povećane propustljivosti krvnih sudova. Talukder i sar. (2015) su pratili koncentraciju AOPP u mleku krava u zavisnosti od faze polnog ciklusa. Navedeni autori su zabeležili najviše koncentracije AOPP u mleku krava u fazi proestrusa, dok nisu uočene razlike u koncentraciji AOPP u mleku između krava koje su ovulirale i onih koje nisu.

6.8. Uticaj SCM izazvanih sa *S. aureus* na aktivnost peroksidaza

U našoj studiji ispitivali smo aktivnost enzima MPO, jednog od najznačajnijih enzima čija se aktivnost povećava tokom inflamatornog procesa. Mijeloperoksidaza je rani marker inflamacije, konvertuje H_2O_2 i hloridne jone u HOCl i time učestvuje u kiseonik-zavisnom

mikrobicidnom dejstvu fagocita, i odbrani organizma. Nakon aktivacije neutrofila u krvi i tkivima, MPO se otpušta u fagolizozome i ekstracelularni prostor (Aratami, 2018). Ovaj enzim se nalazi u azurofilnim granulama u citoplazmi polimorfonuklearnih leukocita, i određivanje aktivnosti MPO može poslužiti kao pokazatelj infiltracije leukocita na mestu inflamacije (Yanaka, 1997). U reakciji MPO sa Cl⁻ nastaje HOCl koja ima baktericidni efekat, ali je izuzetno reaktivna, i u ćelijama brzo reaguje sa SH-grupama, kao primarnim metama (Winterbourn i sar., 2000). Poznato je da se u prisustvu nitrita, H₂O₂ i MPO, formiraju RNS, koje mogu dovesti do oštećenja lipida i proteina (Eiserich i sar., 1998). Dokazano je da ceruloplazmin inhibira MPO i njenu baktericidnu aktivnost (Bakhautdin i sar., 2014; Panasenko i sar., 2016).

U našem istraživanju utvrđena je značajno viša aktivnost MPO u krvnom serumu krava sa supkliničkim mastitisom u poređenju sa zdravim kravama. Utvrđeno je povećanje aktivnosti MPO od 3,03 puta u krvnom serumu SCM₂ grupe u odnosu na zdrave krave. Povišena aktivnost MPO pri zapaljenskim procesima, rezultat je aktivacije neutrofila, i ekstracelularna MPO je nađena u visokoj koncentraciji kod akutnih i hroničnih zapaljenskih procesa (Malara i sar., 2016).

Povišena aktivnosti MPO u mlečnom serumu kao posledica stafilokokne infekcije vimena utvrđena je u našem istraživanju kod krava SCM grupe u poređenju sa kontrolnom grupom. Povećanje aktivnosti MPO u mlečnom serumu bila je od 2,13 puta u grupi krava sa ≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL u poređenju sa aktivnošću ovog enzima u mlečnom serumu zdravih krava. Naši rezultati su u skladu sa istraživanjima Cooray (1994) i Józwick i sar. (2012).

Povišena aktivnost MPO u krvnom i mlečnom serumu krava sa supkliničkim mastitisom znak je degranulacije neutrofila i inflamatornog odgovora mlečne žlezde na prisustvo patogena. U našem istraživanju, utvrđana je pozitivna korelacija MPO i CAT u krvnom serumu, u svim ispitivanim grupama krava, sa statističkom značajnošću. Enzimska aktivnost ovih enzima zavisna je od koncentracije njihovog supstrata H₂O₂ (Thomas i sar., 1988), pa otuda i dobra korelacija.

Pored aktivnosti MPO određivali smo i aktivnost LPO, enzima koji pored MPO pripada grupi peroksidaza koje sadrže hem. Značajno povećanje aktivnosti LPO uočeno je i u krvnom i u mlečnom serumu obe SCM grupe u poređenju sa aktivnošću datog enzima kod zdravih krava. Aktivnosti LPO u mlečnom serumu SCM₂ grupe bila je za 2,32 puta viša nego u mlečnom serumu zdravih krava. Rezultate slične našim prikazali su Silanikove i sar. (2014) koji su utvrdili

značajno višu aktivnost LPO od 5,3 puta u mleku koza iz četvrti inficiranih koagulaza negativnim stafilokokama ($18,1 \pm 1,6$ U/mL) u poređenju sa mlekom neinficiranih četvrti ($3,3 \pm 0,3$ U/mL). Povišenu aktivnost LPO i glutation-peroksidaze u mastitičnom mleku koza i korelaciju sa SCC, utvrdili su i Seifu i sar. (2007). Naši rezultati su u skladu sa Seifu i sar. (2005) koji su ustanovili da je aktivnost LPO u mleku krava za oko 20 puta viša nego u mleku žena i iznosi 1,2 U/mL do 19,4 U/mL. Prema Silanikove i sar. (2005) LPO je glavni potrošač H_2O_2 nastalog tokom sekrecije mleka, što je u njihovoj studiji potvrđeno negativnom korelacijom sa statističkom značajnošću između LPO i H_2O_2 .

Sharma i sar. (2013) su poređenjem sekvenci humanih LPO sa MPO, EPO i TPO utvrdili sličnost između navedenih enzima od 57%, 58% i 46% prema redosledu navođenja. Navedeni rezultati su u skladu sa našim rezultatima gde je utvrđena pozitivna korelacija sa statističkom značajnošću između MPO i LPO u krvnom serumu svih eksperimentalnih grupa krava, sa izrazito jakom korelacijom u SCM₂ grupi.

6.9. Uticaj SCM izazvanih sa *S. aureus* na aktivnost laktat-dehidrogenaze

Tokom mastitisa povećava se propustljivost krvnih sudova vimena, veliki broj enzima iz krvi direktno prelazi u mleko (Roncada i sar., 2012). Prilikom inflamacije i oštećenja epitelijalnih ćelija mlečne žlezde dolazi do sekrecije hidrolitičkih enzima kao što je LDH, enzima koji je značajan indikator oštećenja ćelijske strukture (Sharma i sar., 2016). Ukupnu aktivnost ovog enzima određivali smo u krvnom i mlečnom serumu krava.

U krvnom serumu oglednih grupa i kontrolne grupe krava primećen je porast aktivnosti LDH u prisustvu infekcije *S. aureus*, ali bez statističke značajnosti. U literaturi postoje podaci koji ukazuju na povišenu aktivnosti LDH kod krava sa kliničkim i supkliničkim mastitisom u poređenju sa zdravim kravama (Sharma i sar., 2016; Mir i sar. 2017).

U našem istraživanju u mlečnom serumu utvrđeno je značajno povećanje aktivnosti LDH kod krava SCM₂ grupe u poređenju sa kontrolnom grupom. U skladu sa našim rezultatima su istraživanja brojnih autora (Larsen, 2005; Chagunda i sar., 2006; Hiss i sar., 2007; Sorensen i sar., 2015) koji su utvrdili povišene aktivnosti LDH u mleku krava sa supkliničkim mastitisom. U literaturi postoje podaci da je aktivnost LDH povišena kod ovaca sa supkliničkim mastitisom (Katsoulos i sar., 2010; Sani i sar., 2018). Poređenjem aktivnosti LDH u mlečnom serumu

između SCM₁ i kontrolne grupe utvrđen je porast aktivnosti LDH od 29,70%. Povišena aktivnost LDH u mleku krava sa supkliničim mastitisom, posledica je inflamatornog procesa, oštećenja ćelijske membrane i prelaska ovog enzima u mleko (Mohammadian i sar., 2011). Smatra se da je poreklo LDH meka iz PMN leukocita (Hiss i sar., 2007), epitelijalnih i ćelija intersticijuma, koje se oštećuju tokom inflamatornog procesa (Babaei i sar., 2007; Mohammadian i sar., 2011).

Značajno povišena ukupna aktivnost LDH u našem istraživanju utvrđena u grupi krava sa ≥ 1000 CFU *S. aureus*/mL mleka, ukazuje na veći stepen oštećenja ćelija mlečne žlezde pri većem broju *S. aureus*. Jørgensen i sar. (2016) su utvrdili da su koncentracije LDH više u mleku krava usled intramamarne infekcije vimena, ali i da su varijacije u koncentraciji LDH značajno više kod inficiranih krava u poređenju sa neinficiranim. Isti autori navode da LDH u mleku više odražava odgovor domaćina na infekciju, nego infekciju samu po sebi, odnosno prisustvo bakterija u mlečnoj žlezdi.

U literaturi postoje podaci da aktivnost LDH u mleku pozitivno korelira sa SCC (Chagunda i sar., 2006; Hiss i sar., 2007; Nyman i sar., 2016; Ahmed i Fahim, 2018). Ipak, prema Nyman i sar. (2016) bolju specifičnost i senzitivnost u otkrivanju intramamarnih infekcija krava ima određivanje SCC od merenja aktivnosti LDH i N-acetil- β -D-glukozaminidaze (NAGaze).

Naši rezultati su ukazali da je oštećenje ćelija i tkiva mlečne žlezde kod supkliničkih mastitisa praćeno značajnim povećanjem ukupne aktivnosti LDH u mleku, ali bez značajnog uticaja na aktivnost ovog enzima u krvnom serumu. Više vrednosti za aktivnost LDH u mleku u odnosu na krvni serum ukazuju da krv nije jedini izvor LDH u mastitičnom mleku, već da značajan izvor ovog enzima predstavljaju i leukociti i ćelije parenhima vimena.

Da bi se ispitao uticaj oksidativnog stresa na nivo oštećenja ćelijskih membrana ispitivana je i aktivnost izoenzima LDH kao specifičnog pokazatelja oštećenja membrane u ćelijama određenih organa. Postoji 5 različitih izoenzimskih formi ovog citoplazmatskog enzima (LDH1-5) čija je distribucija tkivno-specifična. Meranjem zastupljenosti izoenzimskih formi LDH sa sigurnošću se može utvrditi oštećenje ćelija tkiva i ustanoviti iz kog tkiva potiče najviši stepen oštećenja ćelija, tako su LDH1 i LDH2 najviše zastupljeni u srcu, bubrezima i eritrocitima, LDH3 u tkivu pluća, tiroideji i nadbubrezima, LDH4 i LDH5 su karakteristični za jetru i skeletne mišiće. U našim ispitivanjima dokazano je povećanje izoformi, koje po pokretljivosti odgovaraju

LDH4 i LDH5 enzimskom obliku LDH mišića (SCM₁) i oštećenja hepatocita (SCM₁ i SCM₂ grupe). Intenzivnije oštećenje hepatocita dokazano je u grupi sa većim brojem *S. aureus*.

Iako se poslednjih godina povećao interes za ispitivanje oksidativnog stresa kod mlečnih krava, i dalje postoji povećana potreba za daljim istraživanjima. I dalje ostaje nejasno da li je oksidativni stres primarni uzrok pojedinih patoloških stanja ili posledica napredovanja i pogoršanja oboljenja. Jasno razumevanje patofiziologije oksidativnog stresa kod mlečnih krava omogućilo bi primenu određenih antioksidanasa u terapiji određenog oboljenja. Dalja istraživanja bi trebalo usmeriti na određivanje pojedinih indikatora oksidativnog stresa kao biomarkera, ali i na standardizaciju tehnika i metoda za njihovo određivanje u svim laboratorijama.

7. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima ove doktorske disertacije i na osnovu analize dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

1. Prisustvo *S. aureus* u mlečnoj žlezdi krava dovodi do značajnog povećanja broja somatskih ćelija u mleku, koje su izvor reaktivnih kiseoničkih radikala u borbi protiv ovog patogena.
2. Polimorfonuklerani leukociti proizvode reaktivne kiseonične vrste, što je dokazano povećanom koncentracijom vodonik-peroksida u krvnom serumu u grupi krava sa većim brojem CFU/mL *S. aureus*. U mlečnom serumu utvrđene su veće koncentracije vodonik-peroksida u obe grupe krava sa supkliničkim mastitisom. *Staphylococcus aureus* poseduje enzim katalazu odgovornu za neutralizaciju vodonik-peroksida, što je potvrđeno nižim koncentracijama ovog molekula od 18% u grupi krava sa većim brojem *S. aureus*.
3. Supklinički mastitis krava izazvan *S. aureus* dovodi do promene u metabolizmu lipida, indukujući inflamatorno stanje organizma, smanjujući antioksidativnu i antiinflamatornu ulogu HDL i povećavajući koncentraciju LDL lipoproteinske čestice.
4. Supklinički mastitis izazvan *S. aureus* dovodi do oksidativnog stresa, menjajući aktivnost enzima antioksidativne odbrane. Inhibicija aktivnosti superoksid-dismutaze je izraženija u mlečnom serumu i iznosi do 48,81%. Visok nivo katalazne aktivnosti, dokazan u eritrocitima od 42,03% i 44,19% kod krava sa supkliničkim mastitisom ne zavisi od broja bakterija. U mlečnom serumu aktivnost ovog enzima je povećana 2,04 i 3,60 puta i zavisi od broja *S. aureus*. Povećana aktivnost katalaze se sa sigurnošću može smatrati indikatorom bakterijske infekcije vimena.
5. Paraoksonaza 1 prema paraoksonu kao supstratu, osetljiva je na inflamaciju, i njena aktivnost je smanjena tokom infekcije kod krava sa brojem *S. aureus* ≥ 1000 CFU/mL do 22,72%, i smatra se negativnim proteinom akutne faze. Jaka korelaciona povezanost između paraoksonazne i arilesterazne aktivnosti PON1, kontrolne grupe i grupa krava sa supkliničkim mastitisom, ukazuje na odsustvo polimorfizma ovog enzima kod krava.

6. Aktivnost PON1-ARE u krvnom serumu, prvi put dokazana u našoj studiji u mlečnom serumu krava sa supkliničkim mastitisom, smanjena je u prisustvu *S. aureus*. Jaka pozitivna korelacija između aktivnosti PON1-ARE u krvi i PON1-ARE u mlečnom serumu, ukazuje da je poreklo ovog enzima u mleku najverovatnije iz krvi, i da se ne sintetise u mlečnoj žlezdi. Pozitivna korelacija između PON1-ARE i koncentracije HDL i negativna korelacija sa LDL, ukazuju da je aktivnost PON1-ARE osetljiviji biomarker na prisustvo *S. aureus* i povećan broj somatskih ćelija, kao i osetljiviji indikator oksidativnih procesa izazvanih na lipoproteinima.
7. Kod krava sa supkliničkim mastitisom iscrpljeni su antioksidativni odbrambeni mehanizmi kako u mlečnoj žlezdi, tako i u organizmu krava u poređenju sa zdravim kravama, što je potvrđeno sniženjem koncentracije TAC korišćenjem DPPH i ABTS testa visoke osetljivosti. Direktna povezanost antioksidativnog statusa i intenziteta inflamacije mlečne žlezde, potvrđena je negativnom korelacijom između SCC i TAC.
8. Usled supkliničkog mastitisa narušena je struktura ćelijske membrane. Veći stepen ćelijskog oštećenja, praćen preko koncentracije MDA i lipidnih hidroperoksida dokazan je u mlečnom serumu i zavisi od broja *S. aureus* i SCC. Pozitivna korelaciona analiza između SCC i LOOH, ukazuje na moguću primenu LOOH kao osetljivijeg biomarkera u praćenju SCM.
9. Povećana osmotska fragilnost membrane eritrocita kod krava sa supkliničkim mastitisom, povezana je sa povećanom lipidnom peroksidacijom, prouzrokovanom prekomernim nastankom i nakupljanjem ROS. Povećani stepen hemolize eritrocita zavisi od broja *S. aureus*, i u grupi krava sa brojem *S. aureus* ≥ 1000 CFU/mL povećanje H_{50} je iznosilo 39,01%.
10. Prisustvo *S. aureus* u mlečnoj žlezdi uvodi organizam u nitrozativni stres, što je potvrđeno veoma visokim koncentracijama nitrita u krvnoj plazmi i mlečnom serumu krava sa supkliničkim mastitisom. Nagrađene reaktivne azotove vrste dovode do oksidacije i smanjenja koncentracije ukupnih SH-grupa u krvnom i mlečnom serumu, što je dokazano jakom negativnom korelacijom između ova dva parametra u kontrolnoj grupi krava i umerenom korelacijom kod krava sa supkliničkim mastitisom.

11. Rani marker u otkrivanju supkliničkog mastitisa i proceni oštećenja proteina, prvi put dokazani u našoj studiji, su povećane koncentracije AOPP, kako u krvnoj plazmi, tako i u mlečnom serumu.
12. Kao posledica stafilokokne infekcije vimena i odgovora organizma na inflamaciju dolazi do povećane aktivnosti H₂O₂-zavisnih peroksidaza (MPO i LPO). Mijeloperoksidazna aktivnost u krvnom i mlečnom serumu, zavisi od broja *S. aureus*, i u krvnom serumu grupe krava sa brojem *S. aureus* \geq 1000 CFU/mL je povećana 3,03 puta, dok je u mlečnom serumu aktivnost povećana 2,13 puta. Razlika u povećanju aktivnosti MPO u krvnom i mlečnom serumu u grupi krava sa brojem *S. aureus* \geq 1000 CFU/mL, posledica je prisustva SPIN proteina koga luči *S. aureus* u mleku koji je odgovoran za inhibiciju MPO. Laktoperoksidazna aktivnost prati povećanje aktivnosti MPO, i u mlečnom serumu grupe krava sa brojem *S. aureus* \geq 1000 CFU/mL dokazano je povećanje od 2,32 puta. Jaka korelaciona analiza potvrđuje sličnost u strukturi i funkciji ova dva enzima, i njihovoj mogućoj primeni kao ranih markera u otkrivanju SCM.
13. Povećanje ukupne aktivnosti LDH u mlečnom serumu grupe krava sa brojem *S. aureus* $<$ 1000 CFU/mL od 29,22% i od 45% grupe krava sa brojem *S. aureus* \geq 1000 CFU/mL ukazuje na veći stepen oštećenja mlečne žlezde pri većem broju *S. aureus*, bez većeg uticaja na ukupnu aktivnost ovog enzima u krvnom serumu. Povećana izoenzimaska aktivnost LDH5 u krvnom serumu krava sa supkliničkim mastitisom ukazuje na oštećenje hepatocita i zavisi od broja *S. aureus*. Ukupna aktivnost LDH u mleku je dobar marker inflamacije mlečne žlezde.

Merenje predloženih biomarkera oksidativnog stresa kod mlečnih krava pomoglo bi u ranijem otkrivanju supkliničkih mastitisa, kao i primeni adekvatne terapije u ranoj fazi supkliničkog mastitisa. Dalja ispitivanja u rasvetljavanju patofiziološkog mehanizma oštećenja tkiva mlečne žlezde kod SCM su neophodna.

8. LITERATURA

- Abernethy JL, Steinman HM, Hill RL. 1974. Bovine erythrocyte superoxide dismutase. Subunit structure and sequence location of the intrasubunit disulfide bond. *J. Biol. Chem.* 2249, 7339-7347.
- Abuelo A, Hernández J, Benedito JL, Castillo C. 2015. The importance of the oxidative status of dairy cattle in the periparturient period: revisiting antioxidant supplementation. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 99, 1003-1016.
- Abuelo A, Hernandez J, Benedito JL, Castillo C. 2013. Oxidative stress index (OSI) as a new tool to assess redox status in dairy cattle during the transition period. *Animal.* 7, 1374-1378.
- Aebi H. 1984. *Methods in Enzymology*, Academic Press, Orlando, 121.
- Agarwal A, Gupta S, Sikka S. 2006. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr. Opin. Obstet. Gyn.* 18, 325-332.
- Aghamohammadi M, Haine D, Kelton DF, Barkema HW, Hogeveen H, Keefe GP, Dufour S. 2018. Herd-level mastitis-associated costs on canadian dairy farms. *Front. Vet. Sci.* 5, 1-12.
- Agner K. 1947. Detoxicating effect of veridoperoxidase on toxins. *Nature.* 159, 271-272.
- Ahariz M, Courtois P. 2010. *Candida albicans* susceptibility to lactoperoxidase-generated hypoiodite. *Clin. Cosmet. Investig. Dent.* 2, 69-78.
- Ahmed LI, Fahim KM. 2018. Incidence of subclinical mastitis with special reference to lactate dehydrogenase (LDH) enzyme as a biomarker. *Int. J. Dairy Sci.* 13, 30-39.
- Akineden O, Annemuller C, Hassan AA, Lammler C, Wolter W, Zschock M. 2001. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk cows with mastitis. *Clin. Diagn. Lab. Immun.* 8, 659-964.
- Alapati SV, Mihas AA. 1999. When to suspect ischemic colitis: Why is this condition so often missed or misdiagnosed? *Postgraduate Medicine.* 105, 177-187.
- Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. 2010. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1634-1650.
- Al-Mabruk RM, Beck NF, Dewhurst RJ. 2004. Effects of silage species and supplement vitamin E on the oxidative stability of milk. *J. Dairy Sci.* 87, 406-412.
- Almeida RA, Matthews KR, Cifrian E, Guidry AJ, Oliver SP. 1996. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* 79, 1021-1026.
- Althaus RL, Molina MP, Rodriguez M, Fernandez N. 2001. Analysis time and lactation stage influence on lactoperoxidase system components in dairy ewe milk. *J. Dairy Sci.* 84: 1829-1835.
- Andrei S, Matei S, Rugină D, Bogdan L, Ștefănuț C. 2016. Interrelationships between the content of oxidative markers, antioxidative status, and somatic cell count in cow's milk. *Czech J. Anim. Sci.* 61, 407-413.
- Andrei S, Matei S, Zinveliu D, Pinteana A, Bunea A, Ciupe S, Groza IS. 2010. Correlations between antioxidant enzymes activity and lipids peroxidation level in blood and milk from cows with subclinical mastitis. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca, Veterinary Medicine.* 67, 6-11.
- Andrei S, Pinteana A, Bunea A, Groza I, Bogdan L, Matei S, Ciupe S, Crainic D. 2009. Non-enzymatic antioxidants concentration and lipids peroxidation level in milk from cows with subclinical mastitis. *Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med.* 66, 196-202.

- Antončić-Svetina, M., Turk, R., Svetina, A., Gereš, D., Rekić, B., Juretić, D., 2011. Lipid status, paraoxonase-1 activity and metabolic parameters in serum heifers and lactating cows related to oxidative stress. *Res. Vet. Sci.* 90, 298-300.
- Aratami Y. 2018. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch. Biochem. Biophys.* 640, 47-52.
- Atakisi O, Oral H, Atakisi E, Merhan O, Pancarci MS, Ozcan A, Marasli S, Polat B, Colak A, Kaya S. 2010. Subclinical mastitis causes alteration in nitric oxide, total oxidant and antioxidant capacity in cow milk. *Res. Vet. Sci.* 89, 10-13.
- Aviram M, Vaya J. 2013. Paraoxonase 1 activities, regulation, and interactions with atherosclerotic lesion. *Curr. Opin. Lipidol.* 24, 339–344.
- Aviram M, Rosenblat M. 2004. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1304-1316.
- Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Erogul J, Sorenson R, Bisgaier CL, Newton RS, La Du B. 1999. Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.* 26, 892-904.
- Baba SP, Bhatnagar A. 2018. Role of thiols in oxidative stress. *Curr. Opin. Toxicol.* 7, 133-139.
- Babaei H, Mansouri-Najand L, Molaei MM, Kheradmand A, Sharifan M. 2007. Assessment of lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase activities in cow's milk as an indicator of subclinical mastitis. *Vet. Res. Commun.* 31, 419-425.
- Badellino KO, Wolfe ML, Reilly MP, Rader DJ. 2008. Endothelial lipase is increased in vivo by inflammation in humans. *Circulation.* 117, 678–685.
- Bakhautdin B, Goksoy Bakhautdin E, Fox PL. 2014. Ceruloplasmin has two nearly identical sites that bind myeloperoxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453, 722-727.
- Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN. 2006. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Dairy Sci.* 89, 1877–1895.
- Barlow JW, Zadoks RN, Schukken YH. 2013. Effect of lactation therapy on *Staphylococcus aureus* transmission dynamics in two commercial dairy herds. *BMC Vet Res.* 9, 28.
- Barrett NE, Grandison AS, Lewis MJ. 1999. Contribution of the lactoperoxidase system to keeping quality of pasteurized milk. *J. Dairy Res.* 66, 73-80.
- Barsotti A, Fabbi P, Fedele M, Garibaldi S, Balbi M, Bezante GP, Risso D, Indiveri F, Ghigliotti G, Brunelli C. 2011. Role of advanced oxidation protein products and thiol ratio in patients with acute coronary syndromes. *Clin. Biochem.* 44, 605-11.
- Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. 2004. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ. Res.* 95, 764–772.
- Baskol G, Demir H, Baskol M, Kilic E, Ates F, Karakukcu C. 2006. Investigation of protein oxidation and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. *Cell Biochem. Funct.* 24, 307–311.
- Bassols A, Turk R, Roncada P. 2014. A proteomics perspective: from animal welfare to food safety. *Curr. Protein Pept. Sc.* 15, 156-168.
- Beattie JH, Gordon MJ, Reid MD, Rucklidge GJ, Kwon CS, Kwun IS. 2006. Hepatic Responses to Dietary Stress in Zinc- and Metallothionein-Deficient Mice. *Exp. Biol. Med.* 231, 1542–1547.
- Beavers WN, Skaar EP. 2016. Neutrophil-generated oxidative stress and protein damage in *Staphylococcus aureus*. *Pathog. Dis.* 74, 1-15.

- Benoy MJ, Essy AK, Sreekumar B, Haridas M. 2000. Thiocyanate mediated antifungal and antibacterial property of goat milk lactoperoxidase. *Life Sci.* 66, 2433–2439.
- Bergmeyer HU, Brent E. 1974. Bergmeyer H.U (Ed.), Section C: Methods for Determination of Enzyme Activity, 2nd ed., 2. Lactate dehydrogenases. Academic Press, New York.
- Bernabucci U, Ronchi B, Basiricò L, Pirazzi D, Rueca F, Lacetera N, Nardone A. 2004. Abundance of mRNA of apolipoprotein B100, apolipoprotein E, and microsomal triglyceride transfer protein in liver from periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 2881–2888.
- Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A. 2002. Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. *J. Dairy Sci.* 85, 2173–2179.
- Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A. 2005. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88, 2017-2026.
- Beutler E, Kuhl W, West C. 1982. The osmotic fragility of erythrocytes after prolonged liquid storage and after reinfusion. *Blood.* 59, 1141-1147.
- Bionaz M, Trevisi E, Calamari L, Librandi F, Ferrari A, Bertoni G. 2007. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions and liver function in transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 740-50.
- Björkman L, Dahlgren C, Karlsson A, Brown KL, Bylund J. 2008. Phagocyte-derived reactive oxygen species as suppressors of inflammatory disease. *Arthritis Rheum.* 58, 2931-2935.
- Blatter MC, James RW, Messmer S, Barja F, Pometta D. 1993. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-85: identity of K-85 with paraoxonase. *Eur. J. Biochem.* 211, 871-879.
- Blum JW, Dosogne H, Hoeben D, Vangroenweghe F, Hammon HM, Bruckmaier RM, Burvenich C. 2000. Tumor necrosis factor alpha and nitrite/nitrate responses during acute mastitis induced by *Escherichia coli* infection and endotoxin in dairy cows. *Domest. Anim. Endocrin.* 19, 223–235.
- Bordignon M, Da Dalt L, Marinelli L, Gabai G. 2014. Advanced oxidation protein products are generated by bovine neutrophils and inhibit free radical production in vitro. *Vet. J.* 199, 162-168.
- Bouchard L, Blais S, Desrosiers C, Zhao X, Lacasse P. 1999. Nitric oxide production during endotoxin-induced mastitis in the cow. *J. Dairy Sci.* 82, 2574–2581.
- Boudjellaba S, Ainouz L, Tennah S, Temim S, Iguer-Ouada M. 2018. Reproduction performance and blood biochemical parameters in dairy cows: Relationship with oxidative stress status. *Veterinary World.* 11, 883-888.
- Boulangier V, Bouchard L, Zhao X, Lacasse P. 2001. Induction of nitric oxide production by bovine mammary epithelial cells and blood leukocytes. *J. Dairy Sci.* 84, 1430–1437.
- Bradley A. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.* 164, 116- 128.
- Bradley PP, Christensen RD, Rothstein G. 1982. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood.* 60, 618-622.
- Breen JE, Green MJ, Bradley AJ. 2009. Quarter and cow risk factors associated with the occurrence of clinical mastitis in dairy cows in the United Kingdom. *J. Dairy Sci.* 92, 2551-2561.
- Browne RW, Koury ST, Marion S, Wilding G, Muti P, Trevisan M. 2007. Accuracy and biological variation of human serum paraoxonase 1 activity and polymorphism (Q192R) by kinetic enzyme assay. *Clin. Chem.* 53, 310-317.

- Bryan NS. 2006. Nitrite in nitric oxide biology: Cause or consequence? A systems-based review. *Free Radic. Biol. Med.* 41, 691–701.
- Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. 2010. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin. Fetal Neonatal. Med* 15, 186-190.
- Cabana VG, Reardon CA, Feng N, Neath S, Lukens J, Getz GS. 2003. Serum paraoxonase: effect of the apolipoprotein composition of HDL and acute phase response. *J. Lipid Res.* 44, 780-792.
- Campos FT, Rincon JAA, Acosta DA, Silveira PAS, Pradié J, Correea MN, Gasperin BG, Pfeifer LFM, Barros CC, Pegoraro LMC, Schneider A. 2017. The acute effect of intravenous lipopolysaccharide injection on serum and intrafollicular HDL components and gene expression in granulosa cells of the bovine dominant follicle. *Theriogenology.* 89, 244-249.
- Camps J, Marsillach J, Joven J. 2009. Pharmacological and lifestyle factors modulating serum paraoxonase-1 activity. *Mini Rev. Med. Chem.* 9, 911-920.
- Cao, Y., Zhang, J., Yang, W., Xia, C., Zhang, H.Y., Wang, Y.H., Xu, C., 2017. Predictive value of plasma parameters in the risk of postpartum ketosis in dairy cows. *J. Vet. Res.* 61, 91-95.
- Capeillère-Blandin C, Gausson V, Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V. 2004. Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products. *Biochim. Biophys. Acta.* 1689, 91-102.
- Caput P. 1996. Govedarstvo, Zagreb, Celeber d.o.o.
- Cardozo VF, Lancheros CAC, Narciso AM, Valereto ECS, Kobayashi RKT, Seabra AB, Nakazato G. 2014. Evaluation of antibacterial activity of nitric oxide-releasing polymeric particles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* from bovine mastitis. *Int. J. Pharmaceut.* 473, 20–29.
- Castillo C, Hernandez J, Bravo A, Lopez-Alonso M, Pereira V, Benedito JL. 2005. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *Vet. J.* 169, 286–292.
- Castillo C, Hernandez J, Lopez-Alonso M, Miranda, M, Benedito JL. 2003. Values of plasma lipid hydroperoxides and total antioxidant status in healthy dairy cows: preliminary observations. *Arch. Anim. Breed.* 46, 227–233.
- Castillo C, Hernandez J, Valverde I, Pereira V, Sotillo J, Lopez-Alonso M, Benedito JL. 2006. Plasma malondialdehyde (MDA) and total antioxidant status (TAS) during lactation in dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 80, 133–139.
- Caswell JL, Middleton DM, Gordon JR. 1998. Production and functional characterization of recombinant bovine interleukin-8 as a specific neutrophil, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 67, 327–340.
- Catakay U. 2005. Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Diabetes Metab.* 31, 551-557.
- Catalgol B, Grune T. 2009. Turnover of oxidatively modified proteins: the usage of in vitro and metabolic labeling. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 8–13.
- Celi P, Gabai G. 2015. Oxidant/antioxidant balance in animal nutrition and health: the role of protein oxidation. *Front. Vet. Sci.* 2, 1-13.
- Celi P, Merlo M, Barbato O, Gabai G. 2012. Relationship between oxidative stress and the success of artificial insemination in dairy cows in a pasture-based system. *Vet. J.* 193, 498–502.

- Celi P, Merlo M, Da Dalt L, Stefani A, Barbato O, Gabai G. 2011. Relationship between late embryonic mortality and the increase in plasma advanced oxidised protein products (AOPP) in dairy cows. *Reprod. Fertil. Dev.* 23, 527–533
- Celi P, Raadsma HW. 2010. Effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) supplementation on the productive performance of dairy cows during mid-lactation. *Anim. Prod. Sci.* 50, 339–344.
- Celi P. 2011. Oxidative stress in ruminants. In: Mandelker L, Vajdovich P, editors. *Studies on Veterinary Medicine. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice*. 5. New York: Humana Press
- Ceron JJ, Tecles F, Tvarijonaviciute A. 2014. Serum paraoxonase 1 (PON1) measurement: an update. *BMC Vet. Res.* 10, 74.
- Chagunda MGG, Friggens NC, Rasmussen MD, Larsen T. 2006. A model for detection of individual cow mastitis based on an indicator measured in milk. *J. Dairy Sci.* 89, 2980-2998.
- Chapman A, Winterbourn C, Jordan BT, A. Kettle A. 2003. Characterization of non-covalent oligomers of proteins treated with hypochlorous acid. *Biochem. J.* 375, 33-40.
- Colombo G, Clerici M, Giustarini D, Portinaro N, Badalamenti S, Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I. 2015. A central role for intermolecular dityrosine cross-linking of fibrinogen in high molecular weight advanced oxidation protein product (AOPP) formation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1850, 1-12.
- Contreras GA, Rodríguez JM. 2011. Mastitis: Comparative etiology and epidemiology. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 4, 339-356.
- Contreras GA, Sordillo LM. 2011. Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 281-289.
- Cooray R. 1994. Use of bovine myeloperoxidase as an indicator of mastitis in dairy cattle. *Vet. Microbiol.* 42, 317-326.
- Cosgrove, K., Coutts, G., Jonsson, I.M., 2007. Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in peroxide stress resistance and are required for survival, persistence and nasal colonization in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 189, 1025-1035.
- Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. 2005. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem. Pharmacol.* 69, 541–550.
- Côté-Gravel J, Malouin F. 2019. Symposium review: Features of *Staphylococcus aureus* mastitis pathogenesis that guide vaccine development strategies. *J. Dairy Sci.* 102, 4727-4740.
- Cucarella C, Tormo MA, Ubeda C, Trotonda MP, Monzon M, Peris C, Amorena B, Lasa I, Penades JR. 2004. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 72, 2177–2185.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. 2006. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem.* 52, 601-623.
- Davidson WS, Silva RAGD, Chantepie S, Lagor WR, Chapman MJ, A. Kontush A. 2009. Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters - relevance to antioxidative function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 870-876.
- Davies H, Richter RJ, Keifer M, Broomfield C, Sowalla J, Furlong CE. 1996. The human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nature Genet.* 14, 334-336.

- Davies KJA. 2000. Oxidative stress, antioxidant defences, and damage removal, repair and replacement systems. *IUBMB Life*. 50, 279–289.
- De Jong NWM, Ramyar KX, Guerra FE, Nijland R, Fevre C, Voyich JM, McCarthy AJ, Garcia BL, van Kessel KPM, van Strijp JAG, Geisbrecht BV, Haas PA. 2017. Immune evasion by a staphylococcal inhibitor of myeloperoxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 114, 9439-9444.
- De la Llera Moya M, McGillicuddy FC, Hinkle CC, Byrne M, Joshi MR, Nguyen V, Tabita-Martinez J, Wolfe ML, Badellino K, Pruscino L, Mehta NN, Asztalos BF, Reilly MP. 2012. Inflammation modulates human HDL composition and function in vivo. *Atherosclerosis*. 222, 390-394.
- Deakin SP, Bioletto S, Bochaton-Piallat ML, R.W. James RW. 2011. HDL-associated paraoxonase-1 can redistribute to cell membranes and influence sensitivity to oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med*. 50, 102-109.
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated oxidation. *Biochem. J*. 324, 1.
- Deaton CM. 2006. The role of oxidative stress in an equine model of human asthma. *Redox Report*. 11, 46-52.
- Decoursey TE, Ligeti E. 2005. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell Mol. Life Sci*. 62, 2173-93.
- Dego KO, van Dijk JE, Nederbragt H. 2002. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Vet. Q*. 24, 181-198.
- Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis*. 15, 316-328.
- Deluyker H A, Van Oye SN, Boucher JF. 2005. Factors affecting cure and somatic cell count after pirlimycin treatment of subclinical mastitis in lactating cows. *J. Dairy Sci*. 88, 604–614.
- Dingwell RT, Leslie KE, Schukken YH, Sargeant JM, Timms LL. 2003. Evaluation of the California mastitis test to detect an intramammary infection with a major pathogen in early lactation dairy cows. *Can. Vet. J*. 44, 413–415.
- Dosogne H, Vangroenweghe F, Mehrzad J, Massart-Leën AM, Burvenich C. 2003. Differential leukocyte count method for bovine low somatic cell count milk. *J. Dairy Sci*. 86, 828–834.
- Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev*. 82, 47–95.
- Dufour S, Fréchette A, Barkema HW, Mussell A, Scholl DT. 2011. Invited review: Effect of udder health management practices on herd somatic cell count. *J. Dairy Sci*. 94, 563-579.
- Dufour S, Labrie J, Jacques M. 2019. The Mastitis Pathogens Culture Collection. *Microbiol. Resour. Announc*. 8, 00133-19.
- Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster, G. 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci*. 72, 68-78.

- Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A. 1998. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature*. 391, 393-397.
- Ellman GK. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77.
- Erskine RJ, Wagner SA, DeGraves FJ. 2003. Mastitis therapy and pharmacology. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 19, 109-138.
- Esposito G, Irons PC, Webb EC, Chapwanya A. 2014. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 144, 60-71.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 11, 81-128.
- Evans JD. 1996. Straightforward statistics for the behavioral sciences. Pacific Grove, CA: Brooks/Cole Publishing.
- Ewida RM, Al-Hosary AAT. 2020. Prevalence of enterotoxins and other virulence genes of *Staphylococcus aureus* caused subclinical mastitis in dairy cows. *Vet. World.* 13, 1193-1198.
- Fan J, Watanabe T. 2003. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J. Atheroscler. Thromb.* 10, 63– 71.
- Farid AS, Honkawa K, Fath EM, Nonaka N, Horii Y. 2013. Serum paraoxonase-1 as biomarker for improved diagnosis of fatty liver in dairy cows. *BMC Vet. Res.* 9, 73-73.
- Fazio F, Casella S, Giannetto C, Giudice E, Piccione G. 2016. Erythrocyte osmotic fragility in response to a short road transport in cattle, horses, and goats. *J. Vet. Behav.* 12, 82-84.
- Feingold KR, Hardardóttir I, Grunfeld C. 1998. Beneficial effects of cytokine induced hyperlipidemia. *Z. Ernährungswiss.* 37, 66-74.
- Ferrari RP, Ghibaudi EM, Traversa S, Laurenti E, De Gioia L, Salmona M. 1997. Spectroscopic and binding studies on the interaction of inorganic anions with lactoperoxidase. *J. Inorg. Biochem.* 68, 17–26.
- Feßler A, Scott C, Kadlec K, Ehricht R, Monecke S, Schwarz S. 2010. Characterisation of *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 619-625.
- Fiore E, Ganesella M, Arfuso F, Giudice E, Piccione G, Lora M, Stefani A, Morgante M. 2014. Glucose infusion response on some metabolic parameters in dairy cows during transition period. *Arch. Tierzucht.* 57, 1–9.
- Forman HJ, Bernardo A, Davies KJ. 2016. What is the concentration of hydrogen peroxide in blood and plasma? *Arch. Biochem. Biophys.* 603, 48-53.
- Fournier C, Kuhnert P, Frey J, Miserez R, Kirchhofer M, Kaufmann T, Steiner A, Graber HU. 2008. Bovine *Staphylococcus aureus*: association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. *Res. Vet. Sci.* 85, 439-448.
- Fox P, Kelly A. 2006. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—Part 1. *Int. Dairy J.* 16, 500–516.
- Furtmuller PG, Jantschko W, Zederbauer M, Jakopitsch C, Arnhold J, Obinger C. 2004. Kinetics of interconversion of redox intermediates of lactoperoxidase, eosinophil peroxidase and myeloperoxidase. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57, 30–31.
- Gabai G, De Luca E, Miotto G, Zin G, Stefani A, Da Dalt L, Barberio A, Celi P. 2019. Relationship between protein oxidation biomarkers and uterine health in dairy cows during the postpartum period. *Antioxidants.* 8, 1-16.

- Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, La Du BN. 1991. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab. Dispos.* 19, 100-106.
- Gardner RS, Ogden NH, Cripp PJ, Billington D, 2003: Separation of bovine plasma lipoproteins by rapid ultracentrifugation method. *J. Comp. Pathol.* 128, 15-23.
- Gaupp R, Ledala N, Somerville GA. 2012. Staphylococcal response to oxidative stress. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 16, 2-33
- Gay C, Collins J, Gebicki JM. 1999. Hydroperoxide assay with the ferric–xylenol orange complex. *Anal. Biochem.* 273, 149–155.
- Gebicki JL, Gebicka L. 1997. Intermicellar material exchange and droplet clustering in AOT reverse micellar systems. A pulse radiolysis study of $(\text{SCN})_2^-$ radical anion spectra and decay. *Phys. Chem.* 101, 10828–10832.
- Ghiselli A, Serafini M, Natela F, Scaccini C. 2000. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Rad. Biol. Med.* 29, 1106-1114.
- Gitto E, Reiter RJ, Karbownik M, Tan D, Gitto P, Barberi S, Barberi I. 2002. Causes of oxidative stress in the pre-and perinatal period. *Biol. Neonate.* 81, 146-157.
- Goff WL, Johnson WC, Wyatt CR, Cluff CW. 1996. Assessment of bovine mononuclear phagocytes and neutrophils for induced L-arginine-dependent nitric oxide production. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 55, 45–62.
- Gordon RJ, Lowy FD. 2008. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin. Infect. Dis.* 46, 350-359.
- Götz F, Bannerman T, Schleifer KH. 2006. The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. *Prokaryotes.* 4, 5–75.
- Grummer RR. 1993. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76, 3882-3896.
- Grunert T, Stessl B, Wolf F, Sordelli DO, Buzzola FR, Ehling-Schulz M. 2017. Distinct phenotypic traits of *Staphylococcus aureus* are associated with persistent, contagious bovine intramammary infections. *Sci. Rep-UK.* doi:10.1038/s41598-018-34371-1.
- Gu B, Zhu Y, Zhu W. 2009. Retinoid protects rats against neutrophil-induced oxidative stress in acute experimental mastitis. *Int. Immunopharmacol.* 9, 223- 229.
- Guevara I, Iwanejko J, Dembinska-Kiec A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, Golabek I, Bartus S, Malczewska-Malec M, Szczudlik A. 1998. Determination of nitrite/ nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin. Chim. Acta.* 274, 177-188.
- Gugliucci A, Caccavello R, Kotani K, Sakane N, Kimura S. 2013. Enzymatic assessment of paraoxonase 1 activity on HDL subclasses: a practical zymogram method to assess HDL function. *Clin. Chim. Acta.* 415, 162-168.
- Gugliucci A. 2014. Activation of paraoxonase 1 is associated with HDL remodeling ex vivo. *Clin. Chim. Acta.* 429, 38-45.
- Gutowski M, Kowalczyk S. 2013. A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *Acta Biochim. Pol.* 60, 1-16.
- Gutteridge JM. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 41, 1819-1828.
- Halliwell B, Gutteridge J. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed., Oxford University Press, New York 851p.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3th ed. Oxford University Press, New York.

- Halliwell B, Whiteman M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142, 231-255.
- Hamed H, El Feki A, Gargouri A. 2005. Total and differential bulk cow milk somatic cell counts and their relation with antioxidant factors. *CR Biol.* 331, 144–151.
- Hanasand M, Omdal R, Norheim KB, Gøransson LG, Brede C, Jonsson G. 2012. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clin. Chim. Acta.* 413, 901–906.
- Hanzawa K, Watanabe S. 2000. Changes in osmotic fragility of erythrocytes during exercise in athletic horse. *J. Equine Sci.* 11, 51-61.
- Haraguchi Y, Toh R, Hasokawa M, Nakajima H, Honjo T, Otsui K, Mori K, Miyamoto-Sasaki M, Shinohara M, Nishimura, Ishida T, Hirata K. 2014. Serum myeloperoxidase/paraoxonase 1 ratio as potential indicator of dysfunctional high-density lipoprotein and risk stratification in coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 234, 288-294.
- Hassett C, Richter RJ, Humbert R, Chapline C, Crabb JW, Omiecinski CJ, Furlong CE. 1991. Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence. *Biochemistry.* 30, 10141-1049.
- Hayyan M, Hashim MA, AlNashef IM. 2016. Superoxide ion, generation and chemical implications. *Chemical. Reviews.* 116, 3029-3085.
- Hébert A, Sayasith K, Sénéchal S, Dubreuil P, Lagacé J. 2010. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol. Lett.* 193, 57-62.
- Heikkilä AM, Nousiainen JI, Pyörälä S. 2012. Cost of clinical mastitis with special reference to premature culling. *J. Dairy Sci.* 95, 139-150.
- Herrera E, Jimenez R, Aruoma OI, Hercberg S, Sanches-Garcia I, Fraga C. 2009. Aspects of antioxidant food and supplements in health and disease. *Nutr. Rev.* 67, 140-144.
- Hicks L. 1980. Occurrence and consequence of superoxide dismutase in milk products 1: A review. *J. Dairy Sci-* 63, 1199—1204.
- Hiss S, Mueller U, Neu-Zahren A, Sauerwein H. 2007. Haptoglobin and lactate dehydrogenase measurements in milk for the identification of subclinically diseased udder quarters. *Vet. Med.* 52, 245-252.
- Holbrook J, Hicks CL. 1978. Variation of Superoxide Dismutase in Bovine Milk. *J. Dairy Sci.* 61, 1072-1077.
- Hyslop PA, Hinshaw DB, Scraufstatter IU, Cochrane CG, Kunz S, Vosbeck K. 1995. Hydrogen peroxide as a potent bacteriostatic antibiotic: Implications for host defense. *Free Radic. Biol. Med.* 19-31.
- Iba T, Hashiguchi N, Nagaoka I, Tabe Y, Murai M. 2013. Neutrophil cell death in response to infection and its relation to coagulation. *J. Intensive Care.* 4, 1-13.
- Islamov BI, Balabanova RM, Funtikov VA. 2002. Effect of bioresonance therapy on antioxidant system in lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Bull. Exp. Biol. Med.* 134, 248-250.
- Ismail Z B. 2017. Mastitis vaccines in dairy cows: Recent developments and recommendations of application. *Vet. World.* 10, 1057–1062.
- James RW, Deakin SP. 2004. The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1986-1994.
- Jaouad L, Milochevitch C, Khalil A. 2003. PON1 paraoxonase activity is reduced during HDL oxidation and is an indicator of HDL antioxidant capacity. *Free Radic. Res.* 37, 77-83.

- Jhambh R, Dimri U, Gupta VK, Rathore R. 2013. Blood antioxidant profile and lipid peroxides in dairy cows with clinical mastitis. *Vet. World.* 6, 271-273.
- Jin L, Yan SM, Shi BL, Bao HY, Gong J. 2014. Effects of vitamin A on the milk performance, antioxidant functions and immune functions of dairy cows. *Anim. Feed Sci. Tech.* 192, 15-23.
- Johler S, Weder D, Bridy C, Huguenin MC, Robert L, Hummerjohann J, Stephan R. 2015. Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. *J. Dairy Sci.* 98, 2944-2948.
- Jørgensen HJ, Nordstoga AB, Sviland S, Zadoks RN, Sølvørød L, Kvitle B, Mørk T. 2016. *Streptococcus agalactiae* in the environment of bovine dairy herds--rewriting the textbooks? *Vet. Microbiol.* 29;184, 64-72.
- Jóźwik A, Krzyżewski J, Strzałkowska N, Poławska E, Bagnicka E, Agnieszka Wierzbicka A, Niemczuk K, Lipińska P, Horbańczuk JO. 2012. Relations between the oxidative status, mastitis, milk quality and disorders of reproductive functions in dairy cows - a review. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 30, 297-307.
- Juven B, Pierson MD. 1996. Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantitation. *J. Food Prot.* 59, 1233-1241.
- Kahl BC, Becker K, Löffler B. 2016. Clinical significance and pathogenesis of staphylococcal small colony variants in persistent infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 29, 401-427.
- Kahl BC. 2014. Small colony variants (SCVs) of *Staphylococcus aureus*: a bacterial survival strategy. *Infect. Genet. Evol.* 21, 515-522.
- Kato Y. 2016. Neutrophil myeloperoxidase and its substrates: formation of specific markers and reactive compounds during inflammation. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 58, 99-104.
- Katoh N. 2002. Relevance of apolipoproteins in the development of fatty liver and fatty liver-related peripartum diseases in dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* 64, 293-307.
- Katsoulos PD, Christodouloupoulos G, Minas A, Karatzia MA, Pourliotis K, Kritas SK. 2010. The role of lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase in the diagnosis of subclinical intramammary infections in dairy sheep and goats. *J. Dairy Res.* 77, 107-111.
- Kehrli ME, Shuster DE. 1994. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland, *J. Dairy Sci.* 77, 619-627.
- Khersonsky O, Tawfik DS. 2006. The histidine 115-histidine 134 dyad mediates the lactonase activity of mammalian serum paraoxonases. *J. Biol. Chem.* 281, 7649-7656.
- Kiyosawa I, Matuyama J, Nyui S, Yoshida K. 1993. Cu, Zn- and Mn-superoxide dismutase concentration in human colostrum and mature milk. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, 676 - 677.
- Klebanoff SJ, Kettle AJ, Rosen H, Winterbourn CC, Nausef WM. 2013. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J. Leukocyte Biol.* 93, 185-198.
- Koivula M, Pitkälä A, Pyörälä S, Mäntysaari EA. 2007. Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new data-base for mastitis pathogens in Finland. *Acta Agric. Scan.* 57, 89-96.
- Komine K, Kuroishi T, Komine Y, Watanabe K, Kobayashi J, Yamaguchi T, Kamata S, Kumagai K. 2004. Induction of nitric oxide production mediated by tumor necrosis factor alpha on staphylococcal enterotoxin C-stimulated bovine mammary gland cells. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11, 203-210.
- Kontush A, Lhomme M, Chapman MJ. 2013. Unraveling the complexities of the HDL lipidome. *J. Lipid Res.* 54, 2950-2963.

- Korhone H, Kaartinen L. 1995. Changes in the composition of milk induced by mastitis. In: Sandholm M., Honkanen-Buzalki T., Kaartinen L., Pyörälä S. (Eds). The bovine udder and mastitis. Gummerus, Jyväskylä, Finland. 76-82.
- Kruidenier L, Verspaget HW. 2002. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease--radicals or ridiculous? *Alimentary Pharm. Therap.* 16, 1997-2015.
- Kulander L, Pauksens K, Venge P. 2001. Soluble adhesion molecules, cytokines and cellular markers in serum in patients with acute infections. *Scand. J. Infect. Dis.* 33, 290-300.
- Kummel J, Stessl B, Gonano M, Walcher G, Bereuter O, Fricker M, Grunert T, Wagner M, Ehling-Schulz M. 2016. Staphylococcus aureus entrance into the dairy chain: Tracking *S. aureus* from dairy cow to cheese. *Front. Microbiol.* 13, 1607-1603.
- Kussendrager KD, van Hooijdonk AC. 2000. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *Br. J. Nutr.* 84, 19-25.
- Larsen T. 2005. Determination of lactate dehydrogenase (LDH) activity in milk by a fluorometric assay. *J. Dairy Res.* 72, 209-216.
- LeBlanc S. 2006. Monitoring programs for transition dairy cows. In: Proceedings of the 26th World Buiatrics Congres, Nice.
- Leishangthem GD, Singh NK, Singh ND, Filia G, Singh A. 2018. Cell free mitochondrial DNA in serum and milk associated with bovine mastitis: a pilot study. *Vet. Res. Commun.* 4, 275-282.
- Levison LJ, Miller-Cushon EK, Tucker AL, Bergeron R, Leslie KE, Barkema HW, DeVries TJ. 2016. Incidence rate of pathogen-specific clinical mastitis on conventional and organic Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 99, 1341-1350.
- Li W, Hosseinian FS, Tsopmo A, Friel JK, Beta T. 2009. Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of breast milk. *Nutrition.* 25, 105-114.
- Linder M, Paduch JH, Grieger AS, Mansion-de Vries E, Knorr N, Zinke C, Teich K, Kromker V. 2013. Cure rates of chronic subclinical Staphylococcus aureus mastitis in lactating dairy cows after antibiotic therapy. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 126, 291-296.
- Lindmark-Månson H, Åkesson B. 2000. Antioxidative factors in milk. *British J. Nutr.* 84, 103-110.
- Lindmark-Månsson H, Bränning C, Aldén G, Paulsson M. 2006. Relationship between somatic cell count, individual leukocyte populations and milk components in bovine udder quarter milk. *J. Dairy J.* 16, 717-727.
- Link JJ, Rohatgi A, De Lemos JA. 2007. HDL cholesterol: physiology, pathophysiology and management. *Curr. Probl. Cardiol.* 32, 268-314.
- Lohrke B, Vierguth T, Kanitz W, Göllnitz K, Becker F, Hurtienne A, Schweigert FJ. 2004. Online journal of veterinary research: OJVR. - ISSN 1328-925X. - 8, 70 - 78.
- Lopez-Pedraza C, Aguirre-Zamorano MÁ, Pérez-Sánchez C. 2017. Mechanisms of atherosclerosis and cardiovascular disease in antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. New therapeutic approaches. *Medicina Clinica.* 149, 160-169.
- Lotz S, Aga E, Wilde I, Van Zandbergen G, Hartung T, Solbach W, Laskay T, 2004. Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2. *J. Leukoc. Biol.* 75, 467-477.

- Lozovoy MA, Simão AN, Hohmann MS, Simão TN, Barbosa DS, Morimoto HK, Reiche EM, Cecchini R, Dichi I. Inflammatory biomarkers and oxidative stress measurements in patients with systemic lupus erythematosus with or without metabolic syndrome. *Lupus*. 20, 1356-64.
- Lundberg A. 2015. Mastitis in dairy cows. Phd Thesis, Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala, Sweden.
- Lykkesfeldt J, Svendsen O. 2007. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet J*. 173, 502-511.
- Mackness M, Mackness B. 2014. Current aspects of paraoxonase-1 research. T. Komoda (Ed.), *The HDL Handbook-Biological Functions and Clinical Implications* (2nd edition), Academic Press, London. pp. 273-291.
- Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connelly PW, Hegele RA. 1996. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol*. 7, 69-76.
- Malara M, Kęska A, Lutosławska. 2016. The contribution of paraoxonase 1 and myeloperoxidase to HDL-cholesterol functionality. *Biomedical. Human Kinetics*. 8, 51-57.
- Mallard BA, Dekkers JC, Ireland MJ, Leslie KE, Sharif S, Vankampen CL, Wagter L, Wilkie BN. 1998. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *J. Dairy Sci*. 81, 585–595.
- Marchegiani FM, Marra F, Olivieri M, Cardelli RW, James M, Boemi C, Franceschi C. 2008. Paraoxonase 1: Genetics and activities during aging. *Rejuven. Res*. 11, 113-127.
- Marcos E, Mazur A, Cardot P, Rayssiguier Y. 1990. The effect of pregnancy and lactation on serum lipid and apolipoprotein B and A¹I levels in dairy cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr*. 64, 133-138.
- Mavangira V, Sordillo LM. 2018. Role of lipid mediators in the regulation of oxidative stress and inflammatory responses in dairy cattle. *Res. Vet. Sci*. 116, 4-14.
- Mayasari N, Chen J, Ferrari A, Bruckmaier RM, Kemp B, Parmentier HK, van Knegsel ATM. 2017. Effect of dry perio length and dietary energy source on inflammatory biomarkers and oxidative stress in dairy cows. *J. Dairy Sci*. 100, 4961-4975.
- McGillicuddy FC, de la Llera Moya M, Hinkle CC, Joshi MR, Chiquoine EH, Billheimer JT, Rothblat GH, Reilly MP. 2009. Inflammation impairs reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation*. 119, 1135–1145.
- McGrath J, Duval SM, Tamassia LFM, Kindermann M, Stemmler RT, de Gouvea VN, Acedo TS, Immig I, Williams SN, Celi P. 2018. Nutritional strategies in ruminants: A lifetime approach. *Res. Vet. Sci*. 116, 28-39.
- McGuinness WA, Kobayashi SD, DeLeo FR. 2016. Evasion of neutrophil killing by *Staphylococcus aureus*. *Pathogens*. 32, 1-13.
- Melchior MB, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J. 2006. Biofilms: a role in recurrent mastitis infection? *Vet. J*. 171, 398-407.
- Mertens A, Verhamme P, Bielicki JK, Phillips MC, Quarck R, Verreth W, Stengel D, Ninio E, Navab M, Mackness B, Mackness M, Holvoet P. 2003. Increased low-density lipoprotein oxidation and impaired high-density lipoprotein antioxidant defense are associated with

- increased macrophage homing and atherosclerosis in dyslipidemic obese mice: LCAT gene transfer decreases atherosclerosis. *Circulation*. 107, 1640–1646.
- Mikola H, Waris M, Tenovuo J. 1995. Inhibition of herpes simplex virus type 1, respiratory syncytial virus and echovirus type 11 by peroxidase-generated hypothiocyanite. *Antivir. Res.* 26, 161-171.
- Miller GY, Bartlett PC, Lance SE, Anderson J, Heider LE. 1993. Costs of clinical mastitis and prevention in dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202, 1230-1236.
- Mir, B.A., Razak, R., Ali, A., Muzamil, S., Mir, M.R., Khaliq, T., Baba, O.K., Rehman, M., Bilal, S., Hussain, I., Rashid, S.M., 2017. Assessment of antioxidant profile in subclinical and clinical mastitis in dairy cattle. *J. Entomol. Zool. Stud.* 5, 1022-1025.
- Miyamoto T, Takahashi Y, Oohashi T, Sato K, Oikawa S. 2005. Bovine paraoxonase 1 activities in serum and distribution in lipoproteins. *J. Vet. Med. Sci.* 67, 243-248.
- Mogarekar MR, Chawhan SS. 2013. The determination of Q192R polymorphism of paraoxonase 1 by using non-toxic substrate p-nitrophenylacetate. *Indian J. Hum. Genet.* 19, 71–77.
- Mohammadian B. 2011. The effect of subclinical mastitis on lactate dehydrogenase in dairy cows. *Int. J. Anim. Vet. Adv.* 3, 161-163.
- Momtaz H, Rahimi E, Tajbakhsh E. 2010. Detection of some virulence factors in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical bovine mastitis in Iran. *Afr. J. Biotechnol.* 9, 3753-3758.
- Nauseef WM. 2014. Diagnostic assays for myeloperoxidase and myeloperoxidase deficiency. *Methods Mol. Biol.* 1124, 537-546.
- Nedić S, Vakanjac S, Samardžija M, Borožan S. 2019. Paraoxonase 1 in bovine milk and blood as marker of subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *Res. Vet. Sci.* 125, 323-332.
- Nicholls SJ, Hazen SL. 2005. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 1102-1111.
- Nicholls SJ, Hazen SL. 2009. Myeloperoxidase modified lipoproteins and atherogenesis. *J. Lipid Res.* 50, 346-351.
- Novak F, Vavrova L, Kodykova J, Hynkova M, Zak A, Novakova O. 2010. Decreased paraoxonase activity in critically ill patients with sepsis. *Clin. Exp. Med.* 10, 21–25.
- Nyman AK, Emanuelson U, Waller KP. 2016. Diagnostic test performance of somatic cell count, lactate dehydrogenase, and *N*-acetyl- β -d-glucosaminidase for detecting dairy cows with intramammary infection. *J. Dairy Sci.* 99, 1440-1448.
- Olaifa F, Ayo JO, Ambali SF, Rekwot PI. 2012. Effect of packaging on changes in erythrocyte osmotic fragility and malondialdehyde concentration in donkeys administered with ascorbic acid. *J. Vet. Res.* 79, 413–418.
- Olde Riekerink RG, Barkema HW, Veenstra S, Poole DE, Dingwell RT, Keefe GP. 2006. Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. *Can. Vet. J.* 47, 567–572.
- Olteacu PA, Broom DM. 2010. The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. *Anim. Welf.* 19, 39-49.

- Osorio JS, Trevisi E, Ji P, Drackley JK, Luchini D, Bertoni G, Looor JJ. 2014. Biomarkers of inflammation, metabolism, and oxidative stress in blood, liver, and milk reveal a better immunometabolic status in periparturient cows supplemented with smartamine m or metasmart. *J. Dairy Sci.* 97, 7437-7450.
- Owens WE, Ray CH, Watts JL, Yancey RJ. 1997. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 80, 313-317.
- Paape MJ, Guidry AJ, Jain NC, Miller RH. 1991. Leukocyte defense mechanisms in the udder. *Flemish Vet. J.* 62, 95–109.
- Paape MJ, Bannerman DD, Zhao X, J.W. Lee JW. 2003. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet. Res.* 34, 597-627.
- Painter KL, Strange E, Parkhill J, Bamford KB, Armstrong-James D, Edwards AM. 2015. *Staphylococcus aureus* adapts to oxidative stress by producing H₂O₂-resistant small-colony variants via the SOS response. *Infect. Immun.* 83, 1830-1844.
- Panasenko OM, Mikhalchik EV, Gorudko IV, Grigorieva DV, Sokolov AV, Kostevich VA, Vasilyev VB, Cherenkevich SN. 2016. The effects of antioxidants and hypohalous acid scavengers on neutrophil activation by hypochlorous acid-modified low-density lipoproteins. *Biophysics.* 61, 420–428.
- Pattison DI, Davies MJ, Hawkins CL 2012. Reactions and reactivity of myeloperoxidase-derived oxidants: differential biological effects of hypochlorous and hypothiocyanous acids. *Free Radic. Res.* 46, 975-95.
- Peeler EJ, Green MJ, Fitzpatrick JL, Morgan KL, Green LE. 2000. Risk factors associated with clinical mastitis in low somatic cell count British dairy herds. *J Dairy Sci.* 83, 2464-2472.
- Piccinini R, Cesaris L, Dapra V, Borromeo V, Picozzi C, Secchi C, Zeconi A. 2009. The role of teat skin contamination in the epidemiology of *Staphylococcus aureus* intramammary infections. *J. Dairy Res.* 76, 36–41.
- Piccinini R, Tassi R, Daprà V, Fenner J, Carter B, Anjum MF. 2012. Study of *Staphylococcus aureus* collected at slaughter from dairy cows with chronic mastitis. *J. Dairy Res.* 79, 249-255.
- Pick E, Keisari Y. 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods.* 38, 161-170.
- Piepers S, Peters K, Opsomer G, Barkema HW, Frankena K De Vliegher S. 2011. Pathogen group specific risk factors at herd, heifer and quarter levels for intramammary infections in early lactating dairy heifers. *Prev. Vet. Med.* 99, 91-101.
- Pinazo-Durán MD, Gallego-Pinazo R, García-Medina JJ, Zanón-Moreno V, Nucci C, Dolz-Marco R, Martínez-Castillo S, Galbis-Estrada C, Marco-Ramírez C, López-Gálvez MI, Galarreta DJ, Díaz-Llópiz M. 2014. Oxidative stress and its downstream signaling in aging eyes. *Clin. Interv. Aging.* 9, 637-52.
- Piotrowska-Tomala KK, Siemieniuch MJ, Szóstek AZ, Korzekwa AJ, Woclawek- Potocka I, Galvão AM, Okuda K, Skarzynski DJ. 2012. Lipopolysaccharides, cytokines, and nitric oxide

- affect secretion of prostaglandins and leukotrienes by bovine mammary gland epithelial cells. *Domest. Anim. Endocrinol.* 43, 278–288.
- Pirillo A, Catapano LA, Norata GD. 2015. HDL in Infectious Diseases and Sepsis, *Handbook of Experimental Pharmacology.* 224, 483-508.
- Politis I, Theodorou G, Lampidonis AD, Kominakis A, Bald A. 2012. Short communication: Oxidative status and incidence of mastitis relative to α -tocopherol concentrations in the postpartum period in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95, 7331–7335.
- Pourtois M, Binet C, Van Tieghem N, Courtois P, Vandenabeele A, Thiry L. 1990. Inhibition of HIV infectivity by lactoperoxidase-produced hypothiocyanite. *J. Biol. Buccale.* 18, 251-253.
- Pradié J, de Campos FT, Rincon JAA, Collares L, Goularte K, Silveira PAS, Pegoraro LMC, Schneider A. 2017. Paraoxonase 1 (PON1) activity in serum, follicular fluid and seminal plasma of sheep. *Rep. Domest. Anim.* 52, 1142-1144.
- Prin-Mathieu C, Le Roux Y, Faure C, Laurent F, Bene C, Moussaoui F. 2002. Enzymatic activities of bovine peripheral blood leukocytes and milk polymorphonuclear neutrophils during intramammary inflammation caused by lipopolysaccharide. *Clinic. Diagn. Lab. Immun.* 9, 812-817.
- Przybylska JA, Albera E, Kankofer M. 2007. Antioxidants in bovine colostrum. *Rep. Domest. Anim.* 42, 402-409.
- Pyörälä S. 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet. Res.* 34, 565-578.
- Rainard P, Foucras G, Fitzgerald JR, Watts JL, Koop G, Middleton JR. 2018. Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, 149–165.
- Rainard P, Poutrel B, Caffin JP. 1982. Lactoferrin and transferrin in bovine milk in relation to certain physiological and pathological factors. *Ann. Rech. Vet.* 13, 321-328.
- Ranjan R, Swarup D, Naresh R, Patra RC. 2005. Enhanced erythrocytic lipid peroxides and reduced plasma ascorbic acid, and alteration in blood trace elements level in dairy cows with mastitis. *Vet. Res. Commun.* 29, 27-34.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231-1237.
- Reihmane D, Jurka A, Tretjakovs P. 2012. The relationship between maximal exercise-induced increases in serum IL-6, MPO and MMP-9 concentrations. *Scand. J. Immunol.* 76, 188-192.
- Rezaee F, Casetta B, Levels JH, Speijer D, Meijers JC. 2006. Proteomic analysis of high-density lipoprotein. *Proteomics.* 6, 721-730.
- Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. 2009. Paraoxonase 1 (PON1) status and substrate hydrolysis. *Toxicol. Appl. Pharm.* 235, 1-9.
- Rizzo A, Pantaleo M, Mutinati M, Minoia G, Trisolini C, Ceci E, Sciorci RL. 2013. Blood and milk oxidative status after administration of different antioxidants during early postpartum in dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 95, 1171-1174.

- Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. 2008. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Letters*. 582, 1783-1787.
- Rollin E, Dhuyvetter KC, Overton MW. 2015. The cost of clinical mastitis in the first days of lactation: An economic modeling tool. *Prev. Vet. Med.* 122, 257-264.
- Roncada P, Piras C, Soggiu A, Turk R, Urbani A, Bonizzi L. 2012. Farm animal milk proteomics. *J. Proteomics*. 75, 4259-4274.
- Rosenson RS, Brewer JHB, Ansell B, Barter P, Chapman MJ, Heinecke JW. 2013. Translation of high-density lipoprotein function into clinical practice: current prospects and future challenges. *Circulation*. 128, 1256-1267.
- Roth E. 2000. Oxygen free radicals and their clinical implications. *Acta Chirurgica Hungarica*. 36, 302-305.
- Ruegg PL. 2011. Dairy Production Medicine. In: Risco. C. (Ed.). John Wiley and sons Inc. pp. 207-232.
- Ruegg PL. 2017. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *J. Dairy Sci.* 12, 10381-10397.
- Russell RJ. 2011. Bovine mastitis. In: Production diseases of dairy animals. Satish serial publishing house. pp.351-390.
- Ryman V E, Pighetti GM, Lippolis JD, Gandy JC, Applegate M, Sordillo LM. 2015. Quantification of bovine oxy-lipids during intramammary *Streptococcus uberis* infection. *Prosta-glandins Other Lipid Mediat.* 121, 207-217.
- Ryšánek D, Babák V, Sládek Z, Toman M. 2001. Variations among unbred heifers in the activities of polymorphonuclear leucocytes from the mammary gland and blood. *J. Vet. Med. B: Infect. Dis. Vet. Public Health*. 48, 31-41.
- Sadek K, Saleh E, Ayoub M. 2017. Selective, reliable blood and milk bio-markers for diagnosing clinical and subclinical bovine mastitis. *Trop. Anim. Health Prod.* 49, 431-437.
- Sandholm M. 1995. Detection of inflammatory changes in the milk. In: Sandholm M., Honkanen-Buzalski T., Kaartinen L., Pyörälä S. (Eds.). *The bovine udder and mastitis*. Gummerus, Jyväskylä, Finland. 89-104.
- Sani RN, Hajigolikhani B, Ahmadi-Hamedani M, Kafshdouzan K. 2018. Diagnostic evaluation of milk lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase activities by receiver operating characteristic analysis curve in early lactation of ewes with subclinical mastitis. *Vet. Res. Forum*. 9, 343-348.
- Santman-Berends IMGA, Lam TJGM, Keurentjes J, van Schaik G. 2015. An estimation of clinical mastitis incidence per 100 cows per year based on routinely collected herd data. *J. Dairy Sci.* 98, 6965-6977.
- Scali F, Camussone C, Calvino LF, Cipolla M, Zaccaroni A. 2015. Which are important targets in development of *S. aureus* mastitis vaccine? *Res. Vet. Sci.* 100 88-99.
- Scandalios JG. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 995-1014.
- Schneider A, Absalon-Medina VA, Esposito G, Correa MN, Butler WR. 2013. Paraoxonase (PON)1, 2 and 3 expression in granulosa cells and PON1 activity in follicular fluid of dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 48, 989-994.

- Schneider A, Correa MN, Butler WR. 2013. Short communication: acute phase proteins in Holstein cows diagnosed with uterine infection. *Res. Vet. Sci.* 95, 269-271.
- Seabra AB, Durán N. 2010. Nitric oxide releasing-vehicles for biomedical applications. *J. Mat. Chem.* 20, 1624–1637.
- Seifu E, Buys EM, Donkin EF. 2005. Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 16, 137-154.
- Seifu E, Donkin EF, Buys EM. 2007. Potential of lactoperoxidase to diagnose subclinical mastitis in goats. *Small Ruminant Res.* 69, 154–158.
- Selmeçi L, Székely M, Soós P, Seres L, Klinga N, Geiger A, Acsády G. 2006. Human blood plasma advanced oxidation protein products (AOPP) correlates with fibrinogen levels. *Free Radic. Res.* 40, 952-958.
- Sen CK. 2001. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med. Sci. Sports Exerc.* 33, 368-70.
- Shacter E. 2000. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab. Rev.* 32, 307–326.
- Sharma L, Verma AK, Rahal A, Kumar A, Nigam R. 2016. Relationship between serum biomarkers and oxidative stress in dairy cattle and buffaloes with clinical and subclinical mastitis. *Biotechnology*. Doi:10.3923/biotech.2016.96.100
- Sharma N, Jeong DK. 2013. Stem cell research: a novel boulevard towards improved bovine mastitis management. *Int. J. Biol. Sc.* 9, 818-829.
- Sharma N, Mukherjee R, Ingale SL, Jadhav RK. 2010. Therapeutic and anti-oxidant activity of vitamin E and selenium in bovine Staphylococcal mastitis. *Indian J. Vet. Sci.* 19, 25-31.
- Shirai F, Kawaguchi M, Yutsudo M, Dohi Y. 2002. Human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes at the ovulatory period are in an activated state. *Mol. Cell. Endocrinol.* 196, 21-28.
- Sies H. 2017. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* 11, 613-619.
- Silanikove N, Merin U, Shapiro F, Leitner G. 2014. Subclinical mastitis in goats is associated with upregulation of nitric oxide-derived oxidative stress that causes reduction of milk antioxidative properties and impairment of its quality. *J. Dairy Sci.* 97, 3449-3455.
- Silanikove N, Rauch-Cohen A, Shapiro F, Arieli A, Merin U, Leitner G. 2012. Lipopolysaccharide challenge of the mammary gland in cows induces nitrosative stress that impairs milk oxidative stability. *Animal.* 6, 1451-1459.
- Silanikove N, Shapiro F, Silanikove M, Merin U, Leitner G. 2009. Hydrogen peroxide-dependent conversion of nitrite to nitrate as a crucial feature of bovine milk catalase. *J. Agric. Food Chem.* 57, 8018-8025 .
- Silanikove N, Shapiro F, Shamaya A, Leitner G. 2005. Role of xanthine oxidase, lactoperoxidase, and NO in the innate immunosystem of mammary secretion during active involution in dairy cows: manipulation with casein hydrolyzates. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 1139–1151.
- Silveira PAS, Butler WR, LaCount SE, Overton TR, Barros CC, Schneider A. 2019. Polymorphisms in the anti-oxidant paraoxonase-1 (PON1) gene associated with fertility of postpartum dairy cows. *Theriogenology.* 125, 303-309.
- Sisecioglu M, Kirecci E, Cankaya M, Ozdemir H, Gulcin I, Atasever A. 2010. The prohibitive effect of lactoperoxidase system (LPS) on some pathogen fungi and bacteria. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 4, 671–677.

- Sládek Z, Ryznarova H, Ryšánek D. 2006. Macrophages of the bovine heifer mammary gland: Morphological features during initiation and resolution of the inflammatory response, *Anat. Histol. Embryol.* 35, 116–124.
- Sloth KHMN, Friggens NC, Løvendahl P, Andersen PH, Jensen J, Ingvarsen KL. 2003. Potential for improving description of bovine udder health status by combined analysis of milk measures. *J. Dairy Sci.* 86, 1221–1232.
- Smith GW, Lyman RL, Anderson KL. 2006. Efficacy of vaccination and antimicrobial treatment to eliminate chronic intramammary *Staphylococcus aureus* infection in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 228, 422-425.
- Smith JD. 2010. Myeloperoxidase, inflammation, and dysfunctional high-density lipoprotein. *J. Clin. Lipidol.* 4, 382-388.
- Sordillo LM, Aitken SL. 2009. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128, 1–3.
- Sordillo LM, Mavangira V. 2014. The nexus between nutrient metabolism, oxidative stress and inflammation in transition cows. *Anim. Prod. Sci.* 54, 1204-1214.
- Sordillo LM, O'Boyle N, Gandy JC, Corl CM, Hamilton E. 2007. Shifts in thioredoxin reductase activity and oxidant status in mononuclear cells obtained from transition dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 90, 1186-1192.
- Sordillo LM. 2018. Symposium review: Oxilipids and the regulation of bovine mammary inflammatory responses. *J. Dairy Sci.* 101, 5629-5641.
- Sorensen LP, Engberg RM, Løvendahl P, Larsen T. 2015. Short communication: Effects of *Bos taurus* autosome 9-located quantitative trait loci haplotypes on enzymatic mastitis indicators of milk from dairy cows experimentally inoculated with *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.* 98, 5440-5447.
- Stancu CS, Toma L, Sima AV. 2012. Dual role of lipoproteins in endothelial cell dysfunction in atherosclerosis. *Cell Tissue Res.* 349, 433-446.
- Stanković S, Majkić-Singh N. 2011. Myeloperoxidase: New roles for an old molecule. *J. Med. Biochem.* 30, 230-236.
- Ster C, Lebeau V, Leclerc J, Fugère A, Veh KA, Roy JP, Malouin F. 2017. In vitro antibiotic susceptibility and biofilm production of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine intramammary infections that persisted or not following extended therapies with cephapirin, pirlimycin or ceftiofur. *Vet. Res.* 48, 56.
- Stevanović J, Borozan S. 2012. Značaj slobodnih radikala u veterinarskoj medicini. Naučna KMD, Beograd
- Su WJ, Chang CJ, Peh HC, Lee SL, Huang MC, Zhao X. 2002. Apoptosis and oxidative stress of infiltrated neutrophils obtained from mammary glands of goats during various stages of lactation. *Am. J. Vet. Res.* 63, 241–246
- Sugino N. 2006. Roles of reactive oxygen species in the corpus luteum. *Anim. Sci. J.* 77, 556-565.
- Suriyasathaporn W, Vinitketkumnien U, Chewonarin T, Boonyayatra S, Kreausukon K, Schukken YH. 2006. Higher somatic cell counts resulted in higher malondialdehyde concentrations in raw cows' milk. *Int. Dairy J.* 16, 1088–1091.
- Sutra L, Poutrel B. 1994. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 40, 79–89.
- Szweda P, Schielmann M, Frankowska A, Kot B, Zalewska M. 2014. Antibiotic resistance *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in Eastern Poland and analysis

- of susceptibility of resistant strains to alternative nonantibiotic agents: lysostaphin, nisin and polymyxin B. *J. Vet. Med. Sci.* 76, 355-362.
- Talukder S, Kerrisk K, Gabai G, Fukutomi A, Celi P. 2015. Changes in milk oxidative stress biomarkers in lactating dairy cows with ovulatory and an-ovulatory oestrous cycles. *Anim. Reprod. Sci.* 158, 86-95.
- Talukder S, Kerrisk KL, Gabai G, Celi P. 2017. Role of oxidant-antioxidant balance in reproduction of domestic animals. *Anim. Prod. Sci.* 57, 1588–1597.
- Taponen S, Nykäsenoja S, Pohjanvirta T, Pitkälä A, Pyörälä S. 2016. Species distribution and in vitro antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitic milk. *Acta Vet. Scand.* 58, 12. doi: 10.1186/s13028-016-0193-8.
- Taponen S, Pyörala S. 2009. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis—Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Vet. Microbiol.* 134, 29–36.
- Tecles F, Caldín M, Tvarijonaviciute A, Escribano D, Martínez-Subiela S, Cerón JJ. 2015. Serum biomarkers of oxidative stress in cats with feline infectious peritonitis. *Res. Vet. Sci.* 100, 12–17.
- Teiber JF, Horke S, Haines DC, Chowdhary PK, Xiao J, Kramer JK. 2008. Dominant role of paraoxonases in inactivation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infect. Immun.* 76, 2512-2519.
- Tentori L, Salvati AM. 1981. Hemoglobinometry in human blood. *Methods. Enzymol.* 76, 707-715.
- Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Byrne HD. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Comp. Anal.* 19, 669-675.
- Thomas EL, Learn DB, Jefferson MM, Weatherred W. 1988. Superoxide-dependent oxidation of extracellular reducing agents by isolated neutrophils. *J. Biol. Chem.* 263, 2178-2186.
- Tiezzi F, Parker-Gaddis KL, Cole JB, Clay JS, Maltecca C. 2015. A genome-wide association study for clinical mastitis in first parity US Holstein cows using single-step approach and genomic matrix re-weighting procedure. *PLoS One.* 10, 1-15.
- Timms LL. 1995. Evaluation of pirlimycin for blitz therapy of chronic *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows. Page 140 in 34th Annu. Mtg. Natl. Mastitis Counc.
- Titov VY, Kosenko OV, Fisinin VI, Klimov NT. 2010. Content of nitric oxide metabolites in cow milk in health and mastitis. *Russ. J. Agric. Sci.* 36, 288–290.
- Tizard I. 2000. *Veterinary Immunology: An Introduction*. (ninth edition), W.B. Saunders company, Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo.
- Tkalec VJ, Majnarić D, Jurmanović J, Habrun B, Cvetnić Ž, Zadravec M, Šeol Martinec B. 2015. Meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* kod krava s mastitisom, prisutnost *mecA* gena i gena za virulenciju. *Mljekarstvo.* 65, 259-268.
- Traverso N, Menini S, Maineri EP, Odetti P, Cottalasso D, Marinari UM, Pronzato MA. 2004. Malondialdehyde, a lipoperoxidation-derived aldehyde, can bring about secondary oxidative damage to proteins. *Journal of Gerontology: Biolog. Sci.* 59, 890-895.
- Turk R, Juretić D, Gereš D, Svetina A, Turk N, Flegar-Meštrić Z. 2008. Influence of oxidative stress and metabolic adaptation on PON1 activity and MDA level in transition dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 108, 98–106.
- Turk R, Folnožić I, Đuričić D, Vince S, Flegar-Meštrić Z, Dobranić T, Valpotić H, Samardžija M. 2016. Relationship between paraoxonase-1 activity and lipid mobilisation in transition dairy cows. *Vet. Arhiv.* 86, 601–612.

- Turk R, Juretić D, Gereš D, Turk N, Rekić B, Simeon-Rudolf V, Svetina A. 2004. Serum paraoxonase activity and lipid parameters in the early postpartum period of dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 76, 57-61.
- Turk R, Piras C, Kovačić M, Samardžija M, Ahmed H, De Canio M, Urbani A, Flegar-Meštrić Z, Soggiu A, Bonizzi L, Roncada P. 2012. Proteomics of inflammatory and oxidative stress response in cows with subclinical and clinical mastitis. *J. Proteomics.* 75, 4412-442.
- Turk R, Podpečan O, Mrkun J, Kosec M, Flegar-Meštrić Z, Perkov S, Starič J, Robić M, Belić M, Zrimšek P. 2013. Lipid mobilisation and oxidative stress as metabolic adaptation processes in dairy heifers during transition period. *Anim. Reprod. Sci.* 114, 109-115.
- Turk R, Podpečan O, Mrkun M, Flegar-Meštrić Z, Perkov S, Zrimšek P. 2015. The effect of seasonal thermal stress on lipid mobilization, antioxidant status and reproductive performance in dairy cows. *Reproduction in domestic animals.* 50, 595-603.
- Vakanjac S, Dražić M, Pavlović V, Gvozdić D, Jovičin M, Đukić M, Stepanović P. 2012. Propylene glycol energy supplementation during peripartur period in dairy cows and reproduction efficiency parameters. *Acta Veterinaria - Beograd.* 62, 249-260.
- Valko M, Rhodes C J, Moncol J, Izakovic M, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44-84.
- Van den Top AM, Van Tol A, Jansen H, Geelen MJ, Beynen AC. 2005. Fatty liver in dairy cows post partum is associated with decreased concentration of plasma triacylglycerols and decreased activity of lipoprotein lipase in adipocytes. *J. Dairy Res.* 72, 129-37.
- Verdi RJ, Barbano DM. 1988. Preliminary investigation of the properties of somatic cell proteases. *J. Dairy Sci.* 71, 534–538.
- Vickers KC, Remaley AT. 2014. HDL and cholesterol: life after the divorce? *J. Lipid Res.* 55, 4-12.
- Villamena FA. 2013. Chemistry of reactive species. In: Villamena FA, editor. *Molecular basis of oxidative stress—chemistry, mechanism, and disease pathogenesis.* Hoboken: John Wiley and Sons, Inc. pp. 1–48.
- Virtanen T, Pihlanto A, Akkanen S, Korhonen H. 2007. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 102, 106-115
- Weiss WP, Hogan JS, Smith KL. 2004. Changes in vitamin C concentrations in plasma and milk from dairy cows after an intramammary infusion of *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.* 87, 32–37.
- Wellnitz O, Bruckmaier RM. 2012. The innate immune response of bovine mammary gland to bacterial infection. *Vet. J.* 192, 148-152.
- Wendel M, Paul R, Heller AR. 2007. Lipoproteins in inflammation and sepsis. II. Clinical aspects. *Intensive Care Med.* 33, 25-35.
- Winterbourn CC, Kettle AJ, Hampton MB. 2016. Reactive oxygen species and neutrophil function. *Annu. Rev. Biochem.* 85, 765–792.
- Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ. 2000. Myeloperoxidase. *Curr. Opin. Hematol.* 7, 53-58.
- Winterbourn CC. 2002. Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicology* . 181–182, 223–227.
- Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. 1996. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 49, 1304–1313.

- Wolfson LM, Sumner SS. 1993. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system—a review. *J. Food Prot.* 56, 887–892.
- Yanaka K, Camarata PJ, Spellman SR, Skubitz AP, Furcht LT, Low WC. 1997. Laminin peptide ameliorates brain injury by inhibiting leukocyte accumulation in a rat model of transient focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17, 605- 611.
- Yang FL, Li XS. 2015. Role of antioxidant vitamins and trace elements in mastitis in dairy cows. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* 2, 1-9.
- Yilmaz-Ersan L, Ozcan T, Akpınar-Bayızit A, Sahin S. 2018. Comparison of antioxidant capacity of cow and ewe milk kefir. *J. Dairy Sci.* 101, 3788-3798.
- Yoshida M, Takakuwa Y. 1997. Method for the simultaneous assay of initial velocities of lactate dehydrogenase isoenzymes following gel electrophoresis. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 34, 167-175.
- Zadeh NJ. 1999. Ferrous ion oxidation in presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxides in plasma. *Methods. Enzymol.* 300, 58–62.
- Zadoks RN, Allore HG, Hagenaars TJ, Barkema HW, Schukken YH. 2002. A mathematical model of *Staphylococcus aureus* control in dairy herds. *Epidemiol. Infect.* 129, 397-416.
- Zecconi A, Bronzo V, Piccinini R, Spreafico G, Rufo G. 1994. Phagocytic activity of bovine polymorphonuclear leukocytes, *J. Dairy Res.* 61, 271–279.
- Zecconi A. 2010. *Staphylococcus aureus* mastitis: what we need to know to control them. *Isr. J. Vet. Med.* 65, 93–99.
- Zhang R, Brennan ML, Shen Z, MacPherson JC, Schmitt D, Molenda CE, Hazen SL. 2002. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J. Biol. Chem.* 277, 46116-4622.
- Zhao X, Lacasse P. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: cause and control. *J. Anim. Sci.* 86, 57-65.
- Zigo F, Elecko J, Vasil M, Ondrasovicova S, Farkasova Z, Malova J, Takac L, Zigova M, Bujok J, Pecka-Kielb E, Timkovicova-Lackova P. 2019. The occurrence of mastitis and its effect on the milk malondialdehyde concentrations and blood enzymatic antioxidants in dairy cows. *Vet. Med-Czech.* 64, 423–432.
- Zschöck M, Kloppert B, Wolter W, Hamann H.P., Lämmler C.H. 2005. Pattern of enterotoxin genes *seg*, *she*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 108, 243-249.

BIOGRAFIJA

Svetlana Nedić je rođena 07.04.1980. godine u Vukovaru. Po završetku Gimnazije Vukovar upisala je Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, na kom je diplomirala 2008. godine. Stručni staž je odradila na Katedri za Higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla, na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Na Katedri za porodiljstvo, sterilitet i v.o. zaposlena je od 2012. godine u zvanju stručni saradnik. Doktorske akademske studije je upisala školske 2011/2012. Položila je sve ispite predviđene studijskim programom sa prosečnom ocenom 9,86. Završila je specijalističke akademske studije 2020. godine, na Katedri za porodiljstvo, sterilitet i v.o Fakulteta veterinarske medicine.

U periodu od 10.06 do 15.08.2014. godine i od 15.06 do 07.08.2015. godine bila je na obuci u Eurofins Food and Agro Testing, Klepp, Norveška, gde je savladala mikrobiološke i molekularne metode analize namirnica animalnog porekla i vode, kao i hemijske analize vode. Aktivno je učestvovala u pisanju delova udžbenika “Biotehnologija animalne reprodukcije”, i praktikuma “Asistirane reproduktivne tehnike kod domaćih životinja”, koji se odnose na procenu kvaliteta semena domaćih životinja, kao i na pravnu regulative ove oblasti veterinarske reprodukcije.

Kao autor ili koautor do sada je objavila više od 30 naučnih i stručnih radova u časopisima od međunarodnog i nacionalnog značaja i na naučnim skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja. Od toga, pet radova je publikovano u časopisima sa SCI liste (1 rad u kategoriji M21, 1 rad u kategoriji M22 i 3 rada u kategoriji M23).

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana: Nedić Svetlana

broj upisa: 17/20

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Ispitivanje povezanosti oksidativnog stresa i lipidnog statusa kod krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim sa bakterijom *Staphylococcus aureus*“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 17.11.2020.

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Svetlana Nedić

Broj upisa: 17/20

Studijski program: Doktorske akademske studije

Naslov rada: „**Ispitivanje povezanosti oksidativnog stresa i lipidnog statusa kod krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim sa bakterijom *Staphylococcus aureus***“

Mentor 1: Prof. dr Slobodanka Vakanjac

Mentor 2: Prof. dr Slavoljub Jović

Potpisani: Nedić Svetlana

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu 17.11.2020

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Ispitivanje povezanosti oksidativnog stresa i lipidnog statusa kod krava sa supkliničkim mastitisom izazvanim sa bakterijom *Staphylococcus aureus*“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu 17.11.2020.

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.