

Metabolizm tlenowy neutrofilów i monocytów krwi w okresie okołoporodowym u krów zdrowych i z zatrzymaniem łożyska*)

LESZEK KRAKOWSKI, KRZYSZTOF KOSTRO*, ZYGMUNT WRONA, IZABELA KRAKOWSKA**, PIOTR BRODZKI, TOMASZ PIECH, ARTUR KOSTRZEWA***

Zakład Andrologii i Biotechnologii Rozrodu Katedry i Kliniki Rozrodu Zwierząt
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

*Zakład Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych AR,

**Katedra Anatomii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

***Katedra Biologii i Ochrony Środowiska Wydziału Nauk o Zdrowiu AM, ul. Długa 12, 61-848 Poznań

Krakowski L., Kostro K., Wrona Z., Krakowska I., Brodzki P., Piech T., Kostrzeva A.
Activity of oxygen metabolism of neutrophils and monocytes in peripheral blood of cows with or without placenta retention

Summary

The oxygen metabolism of polymorphonuclear leukocytes (PMN) and monocytes (MN) was examined in cows and heifers during the last month of pregnancy and the week after parturition from the perspective of periparturient period disturbances. A cytometric flow analysis was carried out using the Bursttest (Orpegon-Pharma). Various levels of PMN and MN activation were noted, and the differences were found both in cows and in heifers before and after parturition with or without the retention of the placenta. In vitro studies revealed that the best stimulators activating the PMN and MN are Escherichia coli and PMA and that fMLP had the lowest activity. The activity of stimulators depended on the presence of a lower number and expression of receptors for the examined activators on the cell membrane of PMN and MN during the periparturient period. It was also discovered that suppression of nonspecific defence mechanisms induced by pregnancy is recompensed by increased oxygen metabolism of PMN and MN, which are capable of activating and participating in defence reactions.

Keywords: cows, periparturient period, oxygen

Zaburzenia okresu okołoporodowego u krów nie są niczym nowym i występują od dawna. Dotyczą one najczęściej bydła o wysokim standardzie produkcyjnym (13). Wśród czynników etiologicznych wymienia się złe warunki utrzymania, nieprawidłowe żywienie i związane z nim niedobory mikro- i makroelementów oraz białka i energii. Efektem tego jest zatrzymanie błon płodowych, słaba inwolucja macicy oraz stany zapalne endometrium (3, 13, 15). Dodatkowym i istotnym czynnikiem sprzyjającym występowaniu zaburzeń okołoporodowych jest dysfunkcja układu immunologicznego, będąca następstwem zaburzonej homeostazy wewnętrznej organizmu (1, 2, 4, 5). Jedną z głównych przyczyn upośledzenia, a w skrajnych przypadkach całkowitego zaniku odporności komórkowej lub humoralnej, względnie obydwu ich typów jest immunosupresja. Jej następstwem jest

zwiększona podatność na rozwój infekcji śródmacicznych, zamieranie płodów, zaburzenia rozwojowe, przedwczesne porody oraz rodzenie osłabionych lub niezdolnych do życia osobników (7, 8, 10, 11). Prawidłowy przebieg okresu okołoporodowego u krów zależy także w znacznym stopniu od aktywności chemotaktycznej, fagocytarnej i bójczej neutrofilów.

Zdaniem wielu autorów, kosztem poniesionym przez ciężarną samicę jest występowanie immunosupresji o charakterze ogólnym, która utrzymuje się do 3 tygodni po porodzie i sprzyja rozwojowi zakażeń (6, 8, 11). Występująca w okresie ciąży supresja aktywności fagocytarnej, szczególnie zaznaczona w ostatnim okresie jej trwania, jest rekompensowana wzrostem metabolizmu tlenowego komórek polimorfonuklearnych (PMN) i mononuklearnych (MN).

Celem badań było określenie aktywności metabolicznej komórek PMN i MN u krów pierwiastek i wieloródek z prawidłowym i zakłóconym okresem okołoporodowym.

*) Badania zrealizowano w ramach projektu badawczego nr 6 P06K 011 20 finansowanego przez KBN.

Materiał i metody

Badania wykonano w okresie wiosenno-letnim w gospodarstwie specjalistycznym o profilu hodowli bydła mlecznego. Do badań użyto 20 klinicznie zdrowych krów wieloródek (3-4 ciąża) rasy cb w wieku 5-6 lat oraz 16 jałówek tej samej rasy w wieku 22-24 miesięcy, będących w 256. dniu ciąży. Analogiczny czas trwania ciąży uzyskano dzięki uprzedniej synchronizacji rui i owulacji.

Użyte do badań zwierzęta były wolne od białaczki, brucelozy i gruźlicy. Warunki żywieniowe i zoohigieniczne nie budziły większych zastrzeżeń. Po wycieleniu się krów i jałówek zwierzęta podzielono na dwie grupy i dwie podgrupy. Wieloródki i pierwiastki z prawidłowym porodem i odejściem błon płodowych stanowiły odpowiednio grupę A i A₁, a wieloródki i pierwiastki, u których doszło do zaburzeń w ostatniej fazie porodu (zatrzymanie łożyska) zaliczono do grupy B z podgrupą B₁. Zatrzymanie łożyska rozpoznano w przypadku pozostawania błon płodowych po upływie 12 godzin od wycielenia. Krew w ilości 10 ml pobierano od krów i jałówek z żyły szyjnej zewnętrznej do jałowych probówek silikonowanych (Vacuette Greiner Labortechnik GmbH, Austria) z dodatkiem heparyny wolnej od środków konserwujących (14 j/ml) w 256. dniu trwania ciąży oraz 14 dni po porodzie.

Do określenia metabolizmu tlenowego neutrofilów i monocytów wykorzystano komercyjny zestaw Bursttest

(Orpegon Pharma, Heidelberg, F.R.G.). Natomiast do określenia stopnia aktywacji tych komórek użyto białka o właściwościach chemotaktycznych N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) oraz opsonizowanych bakterii *E. coli*. Określając odsetek komórek wykazujących produkcję metabolitów tlenowych po ich pobudzeniu stosowano przekształcony model dihydrorodaminy DHR 123 w R 123, a intensywność wybuchu tlenowego określał średni kanał fluorescencji. Badania wykonano metodą cytometrii przepływowej (Cytron Absolute-Ortho Diagnostic System, Germany) według załączonej procedury.

Uzyskane wyniki badań poddano komputerowej analizie statystycznej. Obliczenia wykonano przy pomocy testu t-Studenta, wyznaczając średnią, odchylenie standardowe oraz istotność różnic na poziomie $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$.

Wyniki i omówienie

Cytometryczna analiza leukocytów krwi obwodowej bydła umożliwia obiektywną ocenę ilościową leukocytów oraz szczegółową identyfikację ich populacji. Stwarza ona także możliwość szybkiej oceny właściwości fizycznych i metabolicznych komórek dla różnych stanów fizjologicznych (ciąża, okres poporodowy) i patologicznych (schorzenia okresu okołoporodowego). W badaniach własnych określających stopień aktywacji do metabolizmu tlenowego neutrofilów i monocytów u ciężarnych krów i jałówek wykorzystano trzy różne aktywatory (*E. coli*, fMLP i PMA). Badania wykazały, że zarówno u krów i jałówek w ostatnim miesiącu ciąży, jak i po porodzie (tab. 1 i 3) najsilniejszym aktywatorem granulocytów i monocytów krwi obwodowej było PMA i *E. coli*, a najsłabszym fMLP. Z danych przedstawionych w tab. 1 wynika, że u krów w ostatnim miesiącu ciąży, u których po porodzie doszło do zatrzymania łożyska (grupa B) odsetek neutrofilów pobudzonych przez PMA do metabolizmu tlenowego był istotnie wyższy w porównaniu z krowami bez zatrzymania łożyska (grupa A). W grupie B stwierdzono także podwyższony, choć statystycznie nieistotny odsetek granulocytów pobudzonych fMLP oraz statystycznie istotnie niższy odsetek pobudzonych monocytów. Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic pomiędzy obiema badanymi

Tab. 1. Cytometryczna ocena metabolizmu tlenowego komórek PMN i MN we krwi obwodowej ciężarnych krów i jałówek po aktywacji (*E. coli*, fMLP, PMA) ($\bar{x} \pm s$)

Zwierzęta	Grupa	Odsetek pobudzonych neutrofilów			Odsetek pobudzonych monocytów		
		<i>E. coli</i>	fMLP	PMA	<i>E. coli</i>	fMLP	PMA
Krowy (n = 14)	A	55,0 ± 14,3	36,3 ± 19,8	75,2 ^a ± 13,3	23,0 ± 12,9	7,7 ± 4,4	35,9 ± 9,20
Jałówki (n = 10)	A ₁	67,6 ± 15,3	24,8 ± 9,10	84,9 ± 12,1	25,2 ± 14,5	4,4 ^B ± 3,1	29,5 ± 19,7
Krowy (n = 6)	B	46,1 ± 13,1	52,0 ^D ± 18,5	91,0 ± 11,8	14,6 ± 8,40	3,5 ^{aD} ± 1,7	32,6 ± 10,1
Jałówki (n = 6)	B ₁	46,8 ^b ± 7,4	11,0 ^B ± 4,20	83,7 ± 7,4	17,4 ± 7,30	29,5 ± 4,2	33,1 ± 3,20

Objaśnienia: A (krowy), A₁ (jałówki) z prawidłowym porodem i odejściem łożyska, B (krowy), B₁ (jałówki) z zatrzymaniem łożyska; średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie pomiędzy grupami; aA – A i B, bB – A₁ i B₁, cC – A i A₁, dD – B i B₁; (a, b, c, d – $p \leq 0,05$ i A, B, C, D – $p \leq 0,01$).

Tab. 2. Ocena metabolizmu tlenowego komórek PMN i MN we krwi obwodowej ciężarnych krów i jałówek przy użyciu dihydrorodaminy (123 DHR), ($\bar{x} \pm s$)

Zwierzęta	Grupa	Neutrofile			Monocyty		
		% komórek pobudzonych	średni kanał fluorescencji	różnica	% komórek pobudzonych	średni kanał fluorescencji	różnica
Krowy (n = 14)	A	48,9 ^a ± 15,8	141 ± 45,8	62 ± 12,8	20,0 ^A ± 6,20	103 ± 44,1	21 ^a ± 11,4
Jałówki (n = 10)	A ₁	49,2 ± 13,4	79 ^{cb} ± 18,5	53 ^b ± 16,4	9,3 ^{CB} ± 3,42	38 ^C ± 5,23	16 ^B ± 2,34
Krowy (n = 6)	B	72,1 ± 23,2	137 ± 31,2	84 ± 35,0	41,8 ± 12,4	90 ± 27,2	43 ± 25,5
Jałówki (n = 6)	B ₁	71,6 ^B ± 7,31	99 ^d ± 13,6	78 ± 23,2	18,8 ^D ± 7,46	42 ^D ± 4,89	23 ± 4,16

Objaśnienia: jak w tab. 1.

grupami w aktywności neutrofilów i monocytów pobudzonych *E. coli*. Natomiast porównując jałówki z prawidłowym odejściem łożyska (grupa A₁) i jałówek z zatrzymaniem (grupa B₁) (tab. 1) stwierdzono, że w podgrupie B₁ odsetek neutrofilów pobudzonych *E. coli* był istotnie niższy niż w grupie A₁. Istotnie niższy w tej samej grupie był także odsetek neutrofilów pobudzonych fMLP, natomiast wzrósł odsetek pobudzonych monocytów.

Nieco inaczej przedstawiała się ocena intensywności metabolizmu tlenowego z użyciem dihydrorodaminy (DHR). Wyniki zawarte w tab. 2 wskazują, że u krów i jałówek, grupa B i B₁, odsetek pobudzonych DHR neutrofilów i monocytów był istotnie wyższy w porównaniu z grupą A i A₁. Nie stwierdzono natomiast zmian w średnim kanale fluorescencji pomiędzy tymi grupami. Zaobserwowano jednak pewne różnice zarówno w średnim kanale fluorescencji, jak i w odsetku pobudzonych monocytów pomiędzy grupami A i A₁ oraz B i B₁. Odmienne wyniki stwierdzono u krów wieloródek w drugim tygodniu po wycieleniu (tab. 3). Mianowicie, u krów z zatrzymaniem łożyska (grupa B) odsetek neutrofilów pobudzonych *E. coli* i fMLP był istotnie niższy niż w grupie A. W tej samej grupie obserwowano również niższy istotnie odsetek monocytów pobudzonych fMLP. Inaczej przedstawiają się wyniki u pierwiastek z zatrzymaniem łożyska. Z uzyskanych danych wynika, że w podgrupie B₁ odsetek granulocytów i monocytów pobudzonych *E. coli* był istotnie wyższy niż u pierwiastek bez zatrzymania błon płodowych grupa A₁, wzrósł u nich także odsetek monocytów pobudzonych fMLP. Zaobserwowano również pewne różnice w odsetku neutrofilów i monocytów pobudzonych *E. coli*, fMLP i PMA pomiędzy krowami a pierwiastkami grupy A i A₁ oraz B i B₁. Nie stwierdzono natomiast wielu istotnych różnic w odsetku neutrofilów pobudzonych DHR u wieloródek i pierwiastek (tab. 4). Zaobserwowano wzrost odsetka neutrofilów pobudzonych DHR oraz średniego kanału fluorescencji w grupie A w porównaniu z grupą A₁. Stwierdzono także istotny spadek średniego kanału fluorescencji oraz odsetka pobudzonych DHR monocytów w grupie B w stosunku do grupy B₁.

Bezpośrednio przed porodem w organizmie samicy następu-

je zmiana profilu immunologicznego w kierunku prozapalnym typu Th1 i uruchomienie procesu ostrej fazy. Przeprofilowanie takie wspólnie ze zmianą hormonów steroidowych inicjuje poród i bierze udział w wydalaniu płodu oraz inwolucji macicy, jak również pełni rolę mechanizmów immunoregulacyjnych w obrębie macicy (12, 17). Komórki immunokompetentne w okresie okołoporodowym wykazują cechy przestrojenia czynnościowego, zmniejszając, między innymi, ekspresję receptorów adrenergicznych i kortykoidowych, które zabezpieczają je przed wpływem wysokich stężeń hormonów stresu (12). W okresie zbliżającego się porodu w surowicy matki i płodu wzrasta także poziom kortyzolu, który spełnia z jednej strony rolę czynnika adaptacyjnego, z drugiej zaś czynnika regulującego odpowiedź immunologiczną. Podwyższony poziom estrogenów w surowicy krów przed porodem stymuluje wzrost krążących we krwi neutrofilów, które po pokonaniu bariery naczyniowej infiltrują ścianę macicy, a następnie, przenikając do kotyledonów, tworzą swoisty naciek leukocyтары, spełniający istotną rolę w oddzielaniu się łożyska (19, 20).

W dostępnym piśmiennictwie zbyt mało miejsca poświęca się zagadnieniom dotyczącym oceny profilu immunologicznego w przebiegu prawidłowego i zaburzonego okresu okołoporodowego. Z najnowszych

Tab. 3. Cytometryczna ocena metabolizmu tlenowego komórek PMN i MN we krwi obwodowej krów wieloródek i pierwiastek w drugim tygodniu po porodzie po aktywacji (*E. coli*, fMLP, PMA) ($\bar{x} \pm s$)

Zwierzęta	Grupa	Odsetek pobudzonych neutrofilów			Odsetek pobudzonych monocytów		
		<i>E. coli</i>	fMLP	PMA	<i>E. coli</i>	fMLP	PMA
Krowy (n = 14)	A	77,5 ± 9,6	35,7 ± 10,3	82,9 ± 9,30	23,2 ^C ± 9,10	5,6 ± 3,9	45,9 ^C ± 16,2
Jałówki (n = 10)	A ₁	71,2 ^b ± 9,9	17,7 ^C ± 8,0	80,1 ± 11,2	41,7 ± 11,7	7,5 ^B ± 3,2	64,1 ± 14,8
Krowy (n = 6)	B	65,2 ^{aD} ± 5,5	24,3 ^a ± 8,6	80,1 ± 5,70	17,4 ^D ± 2,80	1,7 ^{AD} ± 0,6	51,8 ± 20,4
Jałówki (n = 6)	B ₁	82,0 ± 4,9	11,8 ^d ± 4,7	87,4 ± 5,30	58,4 ± 19,6	18,5 ± 7,3	77,8 ± 18,2

Objaśnienia: jak w tab. 1.

Tab. 4. Ocena metabolizmu tlenowego komórek PMN i MN we krwi obwodowej krów wieloródek i krów pierwiastek w drugim tygodniu po porodzie przy użyciu dihydrorodaminy ($\bar{x} \pm s$)

Zwierzęta	Grupa	Neutrofile			Monocyty		
		% komórek pobudzonych	średni kanał fluorescencji	różnica	% komórek pobudzonych	średni kanał fluorescencji	różnica
Krowy (n = 14)	A	75,2 ± 13,1	112 ^C ± 14,6	73 ± 17,3	24,0 ± 14,2	59 ^C ± 13,6	31 ± 15,0
Jałówki (n = 10)	A ₁	56,6 ^C ± 14,7	142 ± 19,6	71 ± 21,3	31,4 ± 12,8	117 ± 13,5	40 ± 11,8
Krowy (n = 6)	B	75,7 ± 3,87	125 ± 17,3	82 ± 12,7	13,3 ^D ± 6,19	56 ^D ± 10,5	23 ^D ± 4,83
Jałówki (n = 6)	B ₁	69,3 ± 14,2	148 ± 23,6	96 ± 18,4	41,8 ± 12,2	110 ± 16,0	43 ± 12,5

Objaśnienia: jak w tab. 1.

badan wynika, że o prawidłowości przebiegu tego okresu w dużym stopniu decydują humoralne i komórkowe mechanizmy odporności nieswoistej, zwłaszcza zdolność metaboliczna komórek fagocytycznych (16). Badania własne wykonane na krów i jałówek w ostatnim miesiącu ciąży oraz po porodzie umożliwiły ocenę zachowania się komórek PMN i MN w zależności od wystąpienia zaburzeń poporodowych. Wyniki badań własnych wykazały, że u krów i jałówek w ostatnim miesiącu ciąży, u których po porodzie doszło do zatrzymania łożyska, aktywność granulocytów i monocytów stymulowana *E. coli* i określona przy użyciu Bursttestu zaadaptowanego do cytometrii przepływowej była istotnie niższa w stosunku do krów i jałówek bez zatrzymania. Natomiast po aktywacji dihydrodaminą odsetek granulocytów i monocytów wykazujących metabolizm tlenowy był istotnie wyższy w tej grupie zwierząt. Zdecydowanie lepszą aktywność neutrofilów i monocytów na wyżej wymienione aktywatory stwierdzono u badanych krów w 14. dniu po porodzie, a szczególnie u krów pierwiastek, u których doszło do zatrzymania łożyska.

Z danych wynika, że dla uzyskania miarodajnych wyników oceny zdolności metabolicznej komórek PMN i MN u krów i jałówek w badaniach *in vitro* zasadniczy wpływ ma rodzaj zastosowanego aktywatora dla tych komórek. Okazało się, że najlepszym aktywatorem komórek fagocytycznych w badaniach *in vitro* jest *E. coli* i PMA, a najłagodniejszym fMLP. Zróżnicowany stopień pobudzenia tych komórek u bydła, podobnie jak wykazano u ludzi, jest uwarunkowany przede wszystkim występowaniem na ich powierzchni różnej liczby receptorów dla użytych aktywatorów i stopniem ich ekspresji (9, 14, 18). Można zatem stwierdzić, że u krów i jałówek z zatrzymaniem łożyska będącego efektem stanu zapalnego, rodzaj użytego aktywatora dla komórek PMN i MN miał zasadniczy wpływ na wartość uzyskanych wyników dotyczących ich aktywności metabolicznej. Z danych uzyskanych w badaniach własnych wynika, że występująca w ostatnim miesiącu ciąży supresja aktywności fagocytarnej jest rekompensowana wzrostem metabolizmu tlenowego komórek PMN i MN. Świadczy to, że mechanizmy nieswoistej odporności komórkowej w ostatnim okresie ciąży są w pełni zdolne do pobudzenia i wzięcia udziału w reakcjach obronnych oraz procesie oczyszczania macicy w okresie poporodowym. Dla prawidłowej oceny potencjału tlenowego komórek PMN i MN w warunkach *in vitro* konieczny jest dobór odpowiedniego aktywatora. Otrzymane wyniki badań własnych wskazują, że zarówno u krów, jak i jałówek zdolność metaboliczna komórek PMN i MN jest wyraźnie zróżnicowana w zależności od przebiegu okresu okołoporodowego. Rola neutrofilów i monocytów nie ogranicza się wyłącznie do pełnienia głównej roli w procesie fagocytozy jako mechanizmu odporności przeciwwakacyjnej. Pełnią one również funkcję komórek prezentujących antygen limfocytom T

oraz komórek odgrywających ważną rolę w fazie efektorowej odpowiedzi immunologicznej. Monitorowanie aktywności tych komórek w niektórych procesach chorobowych może dostarczyć wielu danych patofizjologicznych, stać się jednym z czynników rokowniczych, a także przyczynić się do oceny zastosowanego leczenia.

Piśmiennictwo

1. Beer A. E., Kwak-Kim J. Y. H.: Immunology of normal pregnancy. Reproductive Medicine Program, Finch University of Health Sciences, Chicago Medical School. 2000, 1-23.
2. Charley B.: The immunology of domestic animals: its present and future. Vet. Immunol. Immunopathol. 1996, 54, 3-6.
3. Chassagne M., Barnouin J., Chacornac J. P.: Predictive markers in the late gestation period for retained placenta in Black-Pied dairy cows under field conditions in France. Theriogenology 1997, 49, 645-656.
4. Deltilleux J. C., Kehrl J., Stabel J. R., Freeman A. E., Kelley D. H.: Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. Vet. Immunol. Immunopathol. 1995, 44, 251-267.
5. Dohm J. E., Metz A.: Stress-mechanisms of immunosuppression. Vet. Immunol. Immunopathol. 1991, 30, 89-109.
6. Dosogne H., Burvenich C., Freeman A. E., Kehrl Jr M. C., Deltilleux J. C., Sulon J., Beckers J. F., Hoeben D.: Pregnancy-associated glycoprotein and decreased polymorphonuclear leukocyte function in early post-partum dairy cows. Vet. Immunol. Immunopathol. 1999, 67, 47-54.
7. Hansen P. J.: Interactions between the immune system and the bovine conceptus. Theriogenology 1997, 47, 121-130.
8. Hussain A. M.: Bovine uterine defense mechanisms. J. Vet. Med. 1989, 36, 641-651.
9. Kajszcak A., Cymerys J., Winnicka A., Niemiński M.: Kinetyka wzrostu bakterii oraz intensywność wybuchu oddechowego neutrofilów izolowanych z mleka krów. Medycyna Wet. 2002, 58, 780-783.
10. Kampen C., Mallard B. A.: Effects of peripartum stress and health on circulating bovine lymphocytes subsets. Vet. Immunol. Immunopathol. 1997, 58, 79-91.
11. Kehrl M. E., Nonnecke B. J., Roth J. A.: Alterations in bovine peripheral blood neutrophil function during the periparturient period. Am. J. Vet. Res. 1989, 50, 207-214.
12. Kostro K., Gliński Z.: Białka ostrej fazy u zwierząt. Wyd. Akademii Rolniczej, Lublin 2003.
13. Kowalski Z. M., Twardoń J.: Wpływ żywienia na płodność krów wysoko mlecznych. Międzynarod. Sesja Nauk. 14-15.06.2002, Polanica Zdrój, s. 27-41.
14. Lehmann A. K., Sornes S., Halstensen A.: Phagocytosis: measurement by flow cytometry. J. Immunol. Method. 2000, 243, 229-242.
15. Malinowski E.: Związek między błędami żywieniowymi i wybranymi schorzeniami narządu rodowego i gruczołu mlekowego. Międzynarod. Sesja Nauk. 14-15.06.2002, Polanica Zdrój, s. 56-62.
16. Malinowski E., Kuźma K., Sobolewska S., Kłossowska A.: Aktywność metaboliczna komórek fagocytycznych mleka i krwi krów zdrowych i z zapaleniem wycienia. Medycyna Wet. 1998, 54, 321-324.
17. Monfardini E., Pinotti L., Cheli F., Savoini G., Burvenich C., Baldi A.: Bovine neutrophil diapedesis and chemotaxis during peripartum in dairy cows. Internat. Symp. Immunology of Ruminant Mammary Gland, Stressa 2000, s. 41-47.
18. Smits E., Burvenich C., Heyneman R.: Simultaneous flow cytometric measurement of phagocytotic and oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes in whole bovine blood. Vet. Immunol. Immunopathol. 1997, 56, 259-269.
19. Subandrio A. L., Noakes D. E.: Neutrophil migration in to the uterine lumen of the cow: The influence of endogenous and exogenous sex steroid hormones using two intrauterine chemoattractants. Theriogenology 1997, 47, 825-835.
20. Subandrio A. L., Sheldon I. M., Noakes D. E.: Peripheral and intrauterine neutrophil function in cow: The influence of endogenous and exogenous sex steroid hormones. Theriogenology 2000, 53, 1591-1608.