

Zależność między polimorfizmem hemoglobiny i transferyny a występowaniem mastitis u owcy kołudzkiej*)

PIOTR KRZYŚCIN, TADEUSZ RYCHLIK

Dział Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego,
ul. Krakowska 1, 32-085 Balice

Krzyścin P., Rychlik T.

Relationship between haemoglobin and transferrin polymorphism and the incidence of mastitis in Kołuda sheep

Summary

The aim of the study was to determine and evaluate the relationships between the susceptibility of Kołuda sheep to mastitis and the presence of polymorphic forms of haemoglobin (HBB) and transferrin (TF) in their blood. Udder health was evaluated twice during lactation by udder palpation and using milk tests for electric resistance, somatic cell count per cm³ and microbiological analysis for the presence of etiological factors of mastitis. The analysis of haemoglobin and transferrin polymorphism in the population of 231 Kołuda sheep showed the presence of 2 alleles at the HBB locus and 6 alleles at the TF locus, which determine the presence of 3 and 15 genotypes of these proteins respectively. The correlations between the presence of the genotypes (as well as the alleles that determine them) and udder health were analysed statistically using the chi-square (χ^2) test. None of the alleles at the HBB locus showed statistical correlations with the incidence of mastitis. The results obtained show that the two alleles of TF^A and TF^P transferrin can be taken to indicate the susceptibility of Kołuda sheep to mastitis and could be used in genetic selection to improve udder health in Kołuda sheep.

Keywords: haemoglobin, transferrin, polymorphism, mastitis, sheep

Stany zapalne wymion powodują znaczne straty w produkcji owczarskiej i są jedną z najczęstszych przyczyn brakowania macierek ze stad, niezależnie od kierunku użytkowania zwierząt. Wobec niewypracowania efektywnych metod weterynaryjnych i braku skutecznych środków farmaceutycznych, przeciwdziałających szerzeniu się tego schorzenia, wskazane jest ciągle doskonalenie metod hodowlanych, opartych na genetycznej zmienności w oporności na *mastitis*. W tym celu poszukuje się nowych wskaźników podatności na zapalenia, które mogłyby być użyte jako kolejne wskaźniki selekcyjne w kierunku poprawy zdrowotności gruczołu mlekowego u owiec. Dotychczasowe badania z wykorzystaniem polimorficznych form hemoglobiny i transferyny wskazują na istnienie pewnych, niejednoznacznych zależności pomiędzy tymi markerami genetycznymi klasy I a cechami produkcyjnymi (1), cechami użyteczności rozplodowej (5, 16) czy wrażliwością na choroby (11, 14) u różnych gatunków zwierząt gospodarskich, w tym owiec. Ważnym zagadnieniem w tych badaniach jest identyfika-

cja genów warunkujących znaczniki genetyczne, które mogą być sprzężone z genami determinującymi wspomniane cechy. W przypadku wykrycia, a następnie oszacowania istotności takich powiązań, poszczególne markery mogłyby zostać uznane za wskaźniki selekcyjne, użyteczne w hodowli zwierząt.

Celem podjętych badań było określenie współzależności pomiędzy wrażliwością macierek owcy kołudzkiej na zapalenia wymion a występowaniem w ich krwi polimorficznych form hemoglobiny i transferyny.

Materiał i metody

Badaniami objęto 231 macierek linii plenno-mlecznej, użytkowanych mlecznie w owczarni Zakładu Doświadczalnego Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego w Kołudzie Wielkiej w latach 2005-2006. Materiał do badań stanowiły próbki mleka, pobierane w ~45. oraz ~90. dniu doju (odpowiednio, w ~100. i ~146. dniu laktacji, trwającej średnio 153 dni), a także próbki krwi, pobierane jednorazowo od matek po odsadzeniu jagniąt.

Ocena zdrowotności wymion objęła badania palpacyjne gruczołu oraz analizy mleka: pomiar jego oporności elektrycznej (przy użyciu elektronicznego wykrywacza stanów *mastitis* firmy Dрамиński – Elektrotechnika w Rolnictwie)

*) Praca finansowana z działalności statutowej Instytutu Zootechniki – PIB, temat nr 3118.1.

(17), a także oznaczenie liczby komórek somatycznych w 1 cm³ (l.k.s.), wykonane dwukrotnie w okresie doju metodą fluoro-opto-elektroniczną (19) przy użyciu aparatu Combifoss /Fossomatic/ (PN-EN ISO 13366:2002). Próbkę mleka badanych owiec, uzyskiwane niezależnie z każdej połówki wymienia w objętości ok. 100-150 cm³ (w zależności od dostępności), rozdysponowano do pomiaru oporności elektrycznej (~30 cm³) oraz przygotowania materiału do badań laboratoryjnych: liczby komórek somatycznych (50-80 cm³) i posiewów mikrobiologicznych (20-50 cm³), z wykorzystaniem sterylnych pojemników. Dotyczyło to badań zarówno w pierwszym, jak i w drugim terminie. W przypadku stwierdzenia obniżonej oporności mleka (poniżej 330 jednostek oporności elektrycznej (j.o.e.)), pochodzącego choć z jednej połówki, jak również przy różnicowaniu pomiarów oporności pomiędzy połówkami (≥ 50 j.o.e.), maciorę uznawano za zwierzę z podejrzeniem stanu zapalnego wymienia, a jej mleko (niezależnie z każdej części wymienia) analizowano na zawartość komórek somatycznych*). W pozostałych przypadkach (owce prawdopodobnie wolne od *mastitis*) tworzone próbki zbiorczą, zawierającą mleko z obu połówek i przesyłano ją do laboratoryjnego określenia liczby komórek somatycznych*). Ponadto mleko, charakteryzujące się obniżoną opornością elektryczną, poddawano analizom mikrobiologicznym**), oznaczając występowanie drobnoustrojów chorobotwórczych – czynników etiologicznych *mastitis* według powszechnie obowiązujących zasad (9). Należy dodać, że przeprowadzono także kontrolne posiewy (50 analiz) dla losowo wybranych próbek mleka 22 maciorek, nie wykazującego obniżonej oporności elektrycznej. Na podstawie wyników przeprowadzonych badań wydzielono ze stada grupę maciorek ze zdiagnozowanym stanem zapalnym wymienia o zróżnicowanym nasileniu (*mastitis*⁺) oraz grupę owiec wolnych od tego schorzenia (*mastitis*⁻). Do grupy zwierząt uznanych za chore zaliczano te maciorki, w których mleku (uzyskany choćby z jednej części wymienia i choćby w jednym z dwóch terminów doju) stwierdzono zarówno podwyższoną liczbę komórek somatycznych (l.k.s. ≥ 500 tys./1 cm³), jak i obecność patogennych mikroorganizmów. Pozostałe owce zaliczono do grupy zwierząt nie wykazujących stanu zapalnego gruczołu mlekowego.

Polimorficzne warianty hemoglobiny i transferyny oznaczano w obu grupach za pomocą elektroforezy poziomej w żelu skrobiowym, stosując zmodyfikowane metody, odpowiednio: Evansa (3) oraz Smithiesa (15). Częstość występowania alleli hemoglobiny i transferyny wyliczono dla obu grup poprzez bezpośrednie zsumowanie liczby genów. Frekwencję genotypów białek stanowił stosunek liczby maciorek posiadających dany genotyp do ogółu badanych owiec. Zależności pomiędzy występowaniem genotypów w *loci* HBB i TF (oraz warunkujących je alleli) i zdrowotnością wymion oceniano stosując test zależności χ^2 .

*) Oznaczenia liczby komórek somatycznych w mleku wykonano w Laboratorium Oceny Mleka PFHBiPM w Krotoszynie.

**) Badania bakteriologiczne mleka przeprowadzono w Zakładzie Higieny Weterynaryjnej WIW w Bydgoszczy.

Wyniki i omówienie

Wstępną ocenę zdrowotności wymion metodami weterynaryjno-zootechnicznymi (palpacja gruczołu i badanie oporności elektrycznej mleka) przeprowadzono w owczarni i każdorazowo obejmowała ona wszystkie aktualnie dojrzone maciorki. Obniżoną oporność elektryczną stwierdzono w mleku, uzyskanym ogółem od 60 maciorek; u czterech spośród nich zanotowano wyczuwane omacywaniem zmiany w gruczole (w dwóch przypadkach były to twarde guzy jajowatego kształtu, w dwóch pozostałych – nieregularne zgrubienia i stwardnienia fragmentów tkanki gruczołu). U trzech kolejnych owiec stwierdzono uszkodzenia strzyków, takie jak blizny i naderwania z okresu karmienia, z podejrzeniem przebytych stanów zapalnych wymion.

Badaniami laboratoryjnymi mleka objęto 394 próbki połówkowe (mleko z jednej połówki wymienia), uzyskane od owiec z podejrzeniem stanu zapalnego gruczołu mlekowego. Wyniki oznaczeń liczby komórek somatycznych oraz występowanie patogennej mikroflory bakteryjnej w mleku podano w tab. 1.

Oznaczenie liczby komórek somatycznych w mleku oraz jego analiza mikrobiologiczna to powszechnie uznane metody określania stanu zdrowotnego gruczołu mlekowego u przeżuwaczy (2, 9, 10). Wraz ze wzrostem l.k.s. obserwowano wzrost udziału próbek, zakażonych przez patogeny, a tendencja ta była zachowana dla obu terminów badań. W 297 próbkach mleka wykryto drobnoustroje, uważane za czynniki etiologiczne *mastitis* (10, 20), to jest paciorkowce (*Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*), gronkowce koagulazoujemne (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus warneri*) i koagulazodatnie (*Staphylococcus aureus*), pałeczki *Escherichia coli* oraz grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida*. W mleku 6 matek, charakteryzującym się obniżoną opornością elektryczną, nie stwierdzono ani podwyższonej liczby komórek somatycz-

Tab. 1. Liczba komórek somatycznych i występowanie mikroorganizmów patogennych w próbkach mleka owiec z podejrzeniem stanu zapalnego wymienia

Próbki mleka	Okres doju	Próbki mleka z oznaczoną liczbą komórek somatycznych (l.k.s.) w tys./1 cm ³ mleka						Razem	
		< 500		500 - 1000		> 1000		liczba	%
		liczba	%	liczba	%	liczba	%		
A	~45, dzień	31	14,3	104	47,9	82	37,8	217	100
B		10	32,3	79	76,0	70	85,4	159	73,3
A	~90, dzień	26	14,7	68	38,4	83	46,9	177	100
B		11	42,3	53	77,9	74	89,2	138	78,0
A	Łącznie	57	14,5	172	43,7	165	41,9	394	100
B		21	36,8	132	76,7	144	87,3	297	75,4

Objaśnienia: A – próbki mleka, w których oznaczono liczbę komórek somatycznych w 1 cm³; B – próbki mleka zanieczyszczone przez drobnoustroje chorobotwórcze

nych, ani obecności mikroflory patogennej, toteż owiec tych nie zaliczono do grupy zwierząt ze stwierdzonym schorzeniem.

Kontrolne badania mikrobiologiczne losowo wybranych 50 próbek mleka o zróżnicowanej, lecz zawsze wyższej niż 330 j.o.e. oporności (pochodzących od 22 owiec), nie wykazały obecności drobnoustrojów chorobotwórczych. Na podstawie łącznej analizy powyższych wyników dokonano ostatecznego podziału stada na grupę 54 owiec ze zdiagnozowanym stanem zapalnym gruczołu mlekowego (*mastitis*⁺) oraz grupę 177 macioerek wolnych od tego schorzenia (*mastitis*⁻). Owce zakwalifikowane do grupy zwierząt chorych charakteryzowały się podwyższoną liczbą komórek somatycznych (l.k.s. ≥ 500 tys./1 cm³) oraz jednoczesną obecnością patogennych mikroorganizmów w mleku.

Analiza polimorfizmu hemoglobiny i transferyny w badanej populacji wykazała obecność dwóch alleli w *locus* HBB (A, B) oraz sześciu alleli w *locus* TF (A, B, C, D, E, P). Częstości występowania poszczególnych alleli w obu grupach owiec podano w tab. 2. Zawiera ona także ocenę istotności zróżnicowania frekwencji każdego allelu pomiędzy grupami macioerek o odmiennej zdrowotności gruczołu mlekowego ($\chi^2_{\text{emp.}}$).

Powyższe wyniki wskazują, że żaden z alleli w *locus* HBB nie wykazał statystycznie potwierdzonych korelacji z wystąpieniem *mastitis*. Spośród sześciu alleli transferyny jedynie dwa wykazały statystycznie potwierdzone, istotne powiązania ze stanem zdrowotnym gruczołu mlekowego; allel TF^A – z opornością, a allel TF^P – z podatnością na stany zapalne. Allele wykryte w *loci* HBB oraz TF warunkowały wystąpienie 3 oraz 15 genotypów odpowiednich białek. Częstość występowania poszczególnych genotypów wśród macioerek o zróżnicowanej zdrowotności wymion oraz istotność różnic w ich frekwencji pomiędzy grupą *mastitis*⁺ i grupą *mastitis*⁻ podano w tab. 3.

Stwierdzono istnienie korelacji pomiędzy występowaniem genotypu hemoglobiny HBB-AB, a także genotypów transferyny TF-AA, -AD, -BD, -CC oraz -BC i wyższą zdrowotnością wymion badanych owiec, a wykryte zależności były statystycznie istotne ($0,01 < p \leq 0,05$). Z kolei obecność genotypu HBB-BB oraz genotypów TF-AB, -CD i -DD powiązana była z mniejszą opornością badanych owiec na zapalenie wymion. Skorelowanie to również cechowało się statystyczną istotnością ($0,01 < p \leq 0,05$).

Badania powiązań polimorfizmu transferyny ze zdrowotnością gruczołu mlekowego u owiec żelaznieńskich prowadzili Charon i wsp. (2), wykrywając podobne zależności. Badacze ci stwierdzili, że macioriki o genotypie TF-AD, TF-CC i TF-AC charakteryzowały się lepszą zdrowotnością wymion, co odnośnie do pierwszych dwóch genotypów potwierdziły obecne badania (tab. 3). Ponadto zarówno owce żelaznieńskie, jak i owce kołudzkie o genotypie TF-CD wykazały większą podatność na zapalenia gruczołu mleko-

Tab. 2. Porównanie częstości występowania alleli hemoglobiny (HBB) i transferyny (TF) pomiędzy badanymi grupami owiec

Locus	Allel	Grupa I (<i>mastitis</i> ⁺) n = 54	Grupa II (<i>mastitis</i> ⁻) n = 177	$\chi^2_{\text{emp.}}$
HBB	A	0,5000	0,5791	2,15
	B	0,5000	0,4209	2,15
TF	A	0,1852	0,2966	5,16*
	B	0,2408	0,1865	0,36
	C	0,3333	0,3418	0,03
	D	0,1945	0,1582	0,78
	E	0,0185	0,0141	0,82
	P	0,0277	0,0028	6,25*

Objaśnienia: * – $0,01 < p \leq 0,05$

Tab. 3. Porównanie częstości występowania genotypów hemoglobiny (HBB) i transferyny (TF) pomiędzy badanymi grupami owiec

Locus	Genotyp	Grupa I (<i>mastitis</i> ⁺) n = 54	Grupa II (<i>mastitis</i> ⁻) n = 177	$\chi^2_{\text{emp.}}$
HBB	AA	0,2407	0,2882	1,14
	AB	0,5185	0,5819	53,45*
	BB	0,2407	0,1299	4,47*
TF	AA	0,0185	0,0847	24,31*
	AB	0,1296	0,1186	7,74*
	AC	0,1481	0,1977	1,58
	AD	0,0185	0,0960	21,32*
	AE	0,0185	0,0113	+
	AP	0,0185	0	+
	BB	0,0370	0,0113	+
	BC	0,1296	0,1582	5,02*
	BD	0,0370	0,0735	25,35*
	CC	0,0741	0,1074	14,97*
	CD	0,2222	0,1017	8,38*
	CE	0	0,0057	+
	CP	0,0370	0,0057	+
	DD	0,0926	0,0169	39,42*
	DE	0,0185	0,0113	+

Objaśnienia: * – $0,01 < p \leq 0,05$; + – nie liczono wartości dla frekwencji genotypów poniżej 3%

wego. Charon i wsp. (2) wykryli również powiązania pomiędzy mniejszym stopniem zanieczyszczenia mleka mikroflorą patogenną (idącym w parze z wyższą zdrowotnością wymion) oraz obecnością allelu A w *locus* TF. Uzyskane obecnie wyniki wskazują na istnienie tej zależności także u owiec kołudzkich (tab. 2).

Hemoglobina oraz transferyna należą do białek wiążących żelazo i wykazują znaczny stopień polimorfiz-

mu strukturalnego. Jak dowodzą badania Kmiecica (6), owce długowłniste o odmiennych genotypach transferyny różnią się istotnie w poziomie i aktywności białek, wykazujących powinowactwo do żelaza, np. homozygoty TF-AA wiązały prawie 28% żelaza więcej aniżeli wynosiła średnia w populacji. Autor ustalił także, że zwierzęta z homozygotycznym fenotypem transferyny charakteryzują się wyższą zawartością hemoglobiny we krwi. Niektórzy autorzy (21) formułują tezę o użyteczności alleli laktoferyny u bydła jako wskaźników koncentracji komórek somatycznych w mleku. Jednocześnie opisywane jest w literaturze bakterioobójcze i bakteriostatyczne działanie transferyny, związane z zapobieganiem infekcjom wywołanym przez czynniki etiologiczne *mastitis* (7, 8, 13). Przyjmuje się, że istotną rolę odgrywa tu wysokie powinowactwo białka do jonów Fe^{3+} , będące przyczyną intensywnego chelatowania żelaza. Następuje usuwanie żelaza ze środowiska wzrostu drobnoustrojów i pozbawienie bakterii tego składnika, niezbędnego do ich prawidłowego wzrostu (4, 12, 18). Transferyna może również uszkadzać aktywne komórki patogenów (poprzez selektywne działanie na ściany komórkowe bakterii chorobotwórczych), a zatem obniżać ich zdolność do kolonizacji zdrowych tkanek.

Wspomniane właściwości transferyny wskazują na użyteczność tego białka (oraz alleli, warunkujących jego biosyntezę) do oceny różnic w podatności owiec na zapalenia wymion. Wyniki niniejszych badań wskazują na możliwość uznania dwóch alleli transferyny TF^A i TF^P za wskaźniki wrażliwości badanych macioerek na *mastitis*, co sugeruje ich przydatność w selekcji, mającej na celu poprawę zdrowotności gruczołu mlekowego u owiec kołudzkich. Praktyczne zastosowanie TF^P przy wyborze zwierząt może być jednak ograniczone bardzo niską frekwencją allelu u owiec tej linii. Możliwość wykorzystania polimorfizmu w *loci* transferyny i hemoglobiny w selekcji, ukierunkowanej na polepszenie zdrowotności wymion u owiec, należy rozpatrywać mając na uwadze całą złożoność zagadnienia oporności na *mastitis*, zespół chorobowy o wieloczynnikowej etiologii. Jednakże włączenie kolejnych wskaźników podatności na zapalenia wymion do puli potencjalnych czynników selekcyjnych zwiększa możliwości uzyskania postępu hodowlanego w zakresie zdrowotności u tego gatunku zwierząt gospodarskich.

Wnioski

1. Allel TF^A może zostać przyjęty za wskaźnik oporności na infekcje gruczołu mlekowego u owiec kołudzkich; sugeruje to jego przydatność w selekcji, ukierunkowanej na polepszenie zdrowotności tych owiec.

2. Allel TF^P może zostać uznany za wskaźnik podatności na zapalenia wymion w przebadanej populacji; jego użyteczność w selekcji owcy kołudzkiej może być ograniczona ze względu na niską frekwencję allelu.

3. Brak jest podstaw do uznania któregośkolwiek z alleli hemoglobiny za wskaźnik wrażliwości owiec kołudzkich na *mastitis*, mimo że maciorki o genotypach HBB-AB oraz HBB-BB cechują się zróżnicowaną zdrowotnością wymion, a istotność tych różnic została potwierdzona statystycznie.

Piśmiennictwo

1. Barowicz T., Styczyński H.: Typy hemoglobin a niektóre cechy produkcyjne owiec rasy olkuskiej. Rocz. Nauk. Zoot. 1986, 13, 57-64.
2. Charon K., Lipecka C., Siudek T., Świderek W., Skiba E.: Relationship between transferrin and globulin antigen polymorphism and sheep resistance to mastitis. J. Appl. Genet. 1996, 37, 161-172.
3. Evans J. V., King J. W. B., Cohen B. L., Harris H., Warren F. L.: Genetics of haemoglobin and blood potassium differences in sheep. Nature 1956, 178, 849.
4. Fang W., Oliver S. P.: Identification of lactoferrin-binding proteins in bovine mastitis-causing *Streptococcus uberis*. FEMS Microbiol. Lett. 1999, 176, 91-96.
5. Kaczor U., Rychlik T., Bajda A.: Powiązanie pomiędzy polimorfizmem transferyny (TF) i hemoglobiny (HBB) a płennością życiową polskiej owcy górskiej. Rocz. Nauk. Zoot. 2003, 17, 53-56.
6. Kmiec M.: Association between transferrin polymorphism and some biochemical characters of blood in lambs of Polish long-wool sheep. Genet. Pol. 1992, 33, 147-152.
7. Kutila T., Pyörälä S., Saloniemi H., Kaartinen L.: Antibacterial effect of bovine lactoferrin against udder pathogens. Acta Vet. Scand. 2003, 44, 35-42.
8. Lee N. W., Kawai K., Nakamura I., Tanaka T., Kumura H., Shimazaki K.: Susceptibilities against bovine lactoferrin with microorganisms isolated from mastitic milk. J. Vet. Med. Sci. 2004, 66, 1267-1269.
9. Malinowski E., Kłossowska A.: Diagnostyka zakażeń i zapaleń wymienia. PIWet, Puławy 2002.
10. Pengov A.: The role of coagulase-negative *Staphylococcus* spp. and associated somatic cell counts in the ovine mammary gland. J. Dairy Sci. 2001, 84, 572-574.
11. Rainard P.: Bacteriostasis of *Escherichia coli* by bovine lactoferrin, transferring and immunoglobulins (IgG, IgG2, IgM) acting alone or in combination. Vet. Microbiol. 1986, 11, 103-115.
12. Sender G., Korwin-Kossakowska A., Stepińska U.: Wykorzystanie markerów genetycznych w programie zwalczania mastitis. Medycyna Wet. 2003, 59, 853-856.
13. Seyfert H. M., Henke M., Interthal H., Klusmann U., Koczan D., Natour S., Pusch W., Senft B., Steinhoff U. M., Tuckoricz A., Hobom G.: Defining candidate genes for mastitis resistance in cattle: the role of lactoferrin and lysozyme. Ztschr. Tierzucht Zuchtungsbiol. 1996, 113, 269-276.
14. Sotirov L., Dimitrov I., Djorboneva M., Gelyazkov E.: Polymorphism of C3 complement component in sheep. Trakia J. Sci. 2005, 3, 30-36.
15. Smithies C.: Zone electrophoresis in starch gels: Group variations in the serum proteins of normal human adults. Biochem. J. 1955, 61, 629.
16. Steppa R., Ślósarz P.: Zależność między polimorficznymi formami transferyny i hemoglobiny a wybranymi wskaźnikami rozrodu owiec syntetycznej pełnej linii matecznej 09. Anim. Prod. 1999, 17, 137-143.
17. Świderek W. P., Niżnikowski R., Skomorowska E.: Możliwość wykorzystania elektronicznego wykrywacza podklinicznych stanów zapalnych wymienia u krów, firmy Damiński, w diagnostyce mastitis u owiec. Zesz. Nauk. PTZ 1999, 43, 339-351.
18. Teng C. T.: Lactoferrin gene expression and regulation: an overview. Biochem. and Biol. 2001, 80, 7-16.
19. Vermunt A. E. M., Loeffen G. J. M., Van Der Voet H., Naber M. A. A. M.: Development of reference samples for the calibration and quality control of somatic cell count using an Fossomatic instrument. Ned. Milk Dairy J. 1995, 49, 111-123.
20. Vishinsky Y., Markusfeld-Nir O.: The association between loss of production, high somatic cell count and type of bacteria involved. Proc. 3rd Int. Mastitis Seminar, Tel-Aviv, Israel 1995, s. 36-38.
21. Wojdak-Makymiec K., Kmiec M., Ziemak J.: Associations between bovine lactoferrin gene polymorphism and somatic cell count in milk. Vet. Medicina, Praha 2006, 51, 14-20.

Adres autora: dr inż. Piotr Krzyścin, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice;
e-mail: pkrzysec@izoo.krakow.pl