Artykuł przeglądowy *Review*

Aktywacja wewnątrzjądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-κB w bakteryjnych zapaleniach gruczołu mlekowego u krów

JUSTYNA STRUZIK*), MAREK NIEMIAŁTOWSKI

Zakład Immunologii, Katedra Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Struzik J., Niemiałtowski M.

Activation of intranuclear transcription factor NF-κB in bacterial bovine mastitis

Summary

Inflammations of the bovine mammary gland (mastitis) in a milking herd caused by bacterial and fungal infections contribute to economic losses and remain a big challenge for veterinary medicine. Microorganisms have developed a number of strategies in order to evade the immune response of the host, which makes them significantly difficult to eliminate from the infected host. The intranuclear transcription factor NF-κB (nuclear factor κB) is one of the key elements that participate in inflammatory processes. Numerous studies have confirmed the activation of NF-κB by both gram-positive, mainly Staphylococcus aureus, and gram-negative bacteria, such as e.g. Escherichia coli. The activation of NF-κB is a result of the interaction of pathogen-associated molecular patterns (PAMP), such as LPS (lipopolysaccharides) and LTA (lipoteichoic acid), with particular cell surface receptors (TLRs, toll-like receptors). Staphylococcus aureus and Escherichia coli are responsible for chronic and acute forms of this disease, respectively. This article presents a review of the literature on different research methods: ex vivo (milk examination), in vitro (studies on cell cultures) and in vivo (mouse research models). Studies presented here showed different levels of NF-κB activation in inflammatory mechanisms linked to the activation of neutrophils (PMNs, polymorphonuclear cells) in which epithelial and endothelial cells of the mammary gland are also involved. Moreover, the use of transgenic mice for the detection of NF-κB activity in real time and the studies of apoptosis in the mammary gland are presented in this work. Additionally, the article discusses the influence of mastitis therapy on NF-κB activation. Results of the research on the biological role of NF-κB in described immune mechanisms that are linked to mastitis suggest their usefulness for developing efficient therapeutic strategies (prevention and efficient therapy).

Keywords: mastitis, NF-κB, PMNs, epithelial cells, endothelial cells

Mastitis, czyli zapalenie gruczołu mlekowego, stanowi jeden z ważnych problemów w weterynarii, przede wszystkim ze względów epidemiologicznych oraz ekonomicznych. Dotychczas zidentyfikowano wiele patogenów odpowiedzialnych za rozwój tej jednostki chorobowej, zarówno u zwierząt, jak i u ludzi. Większość tego typu zakażeń spowodowanych jest przez bakterie, a w szczególności ropotwórcze Gram-dodatnie ziarniaki z rodzaju *Staphylococcus* i *Streptococcus* oraz pałeczki Gram-dodatnie (np. z rodzaju *Corynebacterium*) i Gram-ujemne należące do rodzaju *Pseudomonas* czy rodziny *Enterobacteriaceae*. Czynnikiem etiologicznym *mastitis* mogą być również mykoplazmy, algi (*Prototheca sp.*) oraz grzyby (np. *Candida sp*.). Powstawaniu zakażeń gruczołu mlekowego u krów sprzyja niedostateczna higiena doju, obecność drobnoustrojów w otoczeniu zwierzęcia, a także początkowy okres laktacji (do 2 tygodni po wycieleniu), podczas którego następuje osłabienie efektorowych mechanizmów obronnych układu immunologicznego (9, 12).

Dotychczas opisano wiele strategii, dzięki którym mikroorganizmy zdolne są do zasiedlania gruczołu mlekowego i zapoczątkowania procesu zapalnego w jego obrębie. Tego typu zjawiska możliwe są dzięki właściwościom adhezyjnym komórek patogenów bądź też wytwarzaniu przez nie toksyn, enzymów lub białek immunomodulacyjnych, jak np. białka A, które

*) Mgr inż. Justyna Struzik jest doktorantką na dziennym studium doktoranckim „Ksenobiotyki oraz biologia czynników zakaźnych i inwazyjnych" na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej SGGW. Kierownik ww. studiów i promotor: prof. dr hab. Marek Niemiałtowski.

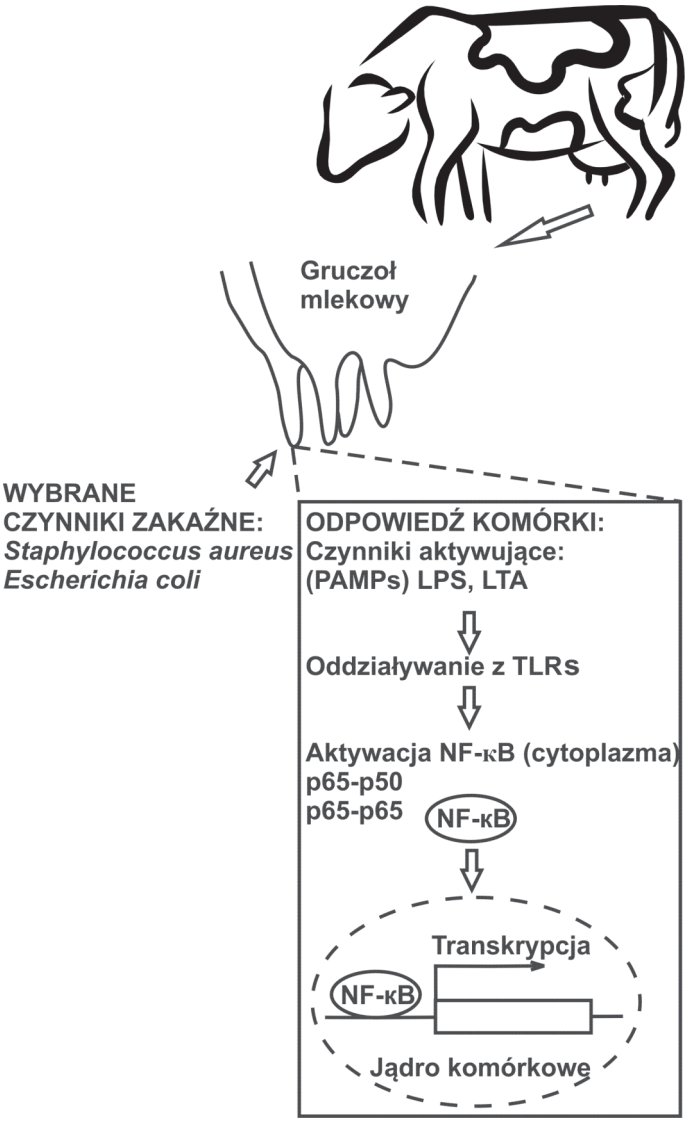
chroni *Staphylococcus aureus* przed sfagocytowaniem przez komórki układu immunologicznego, ponieważ wiąże ono fragment Fc IgG, uniemożliwiając w ten sposób opsonizację tych bakterii (8). Dzięki tego typu oddziaływaniom, mającym na celu „oszukiwanie" mechanizmów obronnych zakażonego organizmu, mikroorganizmy zyskują przewagę nad procesami obronnymi gospodarza, czyniąc je mało skutecznymi. W związku z powyższym istnieje konieczność wnikliwej analizy mechanizmów kluczowych dla oceny patogenności drobnoustrojów na poziomie komórkowym, w celu ich skutecznego wyeliminowania.

Wiele badań nad patogenezą zakażeń bakteryjnych koncentruje się na ich wpływie na metabolizm komórki poprzez oddziaływanie z jej receptorami, co z kolei skutkuje aktywacją ścieżek sygnałowych, które prowadzą do zmian ekspresji genów. Proces transkrypcji, stanowiący etap kluczowy ekspresji genów, zależny jest z kolei od wielu białek, zwanych czynnikami transkrypcyjnymi. Spośród nich czynnik jądrowy NF-κB (nuclear factor κB) stanowi obecnie przedmiot licznych badań ze względu na jego udział we wrodzonych i nabytych mechanizmach odpowiedzi immunologicznej, w przebiegu zapalenia, apoptozy czy też w transformacjach nowotworowych. Istnienie rozlicznych funkcji NF-κB w komórce upoważnia do stwierdzenia, iż jest to czynnik plejotropowy.

Odkrycie NF-κB w latach osiemdziesiątych XX wieku w jądrach limfocytów B myszy jako czynnika kluczowego dla ekspresji genu łańcucha lekkiego kappa immunoglobulin (17) dało początek wielu badaniom, które zaowocowały wprowadzeniem skutecznych terapii w leczeniu chorób nowotworowych bądź alergicznych. Rozwój tego typu schorzeń jest bowiem determinowany przez czynniki, które, oddziaływując na NF-κB, doprowadzają do zaburzeń w jego regulacji.

NF-κB stanowi rodzinę czynników transkrypcyjnych obejmującą białka: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF-κB1 (p105/p50) i NF-κB2 (p100/p52), które występują w komórkach ssaków, gdzie tworzą homo- lub heterodimery i pełnią funkcję aktywatorów bądź represorów transkrypcji. Białka RelA, RelB i c-Rel posiadają zdolność do aktywacji tego procesu dzięki obecności domeny TAD (transcriptional activation domain) na C-końcu. Najczęściej spotykaną formą NF-κB w komórkach ssaków jest heterodimer zbudowany z podjednostek p65 i p50, który występuje w stanie nieaktywnym w cytoplazmie, gdzie związany jest ze specyficznym inhibitorem IκB (inhibitor of κB).

NF-κB aktywowany jest przez wiele czynników, spośród których najpopularniejsze to: IL-1 (interleukina-1) i TNF-α (tumor necrosis factor-α). Ponadto do aktywatorów NF-κB zalicza się: promieniowanie UV, niektóre związki chemiczne, a także produkty wirusowe (np. białka płaszcza wirusów) czy bakteryjne, jak lipopolisacharydy (LPS) (1). Klasyczna droga aktywacji NF-κB polega na bezpośrednim oddziaływaniu ko-



Ryc. 1. Aktywacja czynnika transkrypcyjnego NF-κB w zakażeniach bakteryjnych gruczołu mlekowego u krów
Na skutek działania różnych czynników zakaźnych, jak bakterie *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dochodzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-κB w komórkach gruczołu mlekowego krów. Wymienione patogeny oddziaływują z receptorami na powierzchni komórek, zwanymi TLRs (toll-like receptors) za pomocą tzw. molekularnych wzorców patogenności PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), do których należą elementy ściany komórkowej *Staphylococcus aureus* (LTA, kwas lipotejchojowy) i *Escherichia coli* (LPS, lipopolisacharyd). Taka aktywacja dimerów NF-κB (p65-p50, p65-p65) w cytoplazmie komórki prowadzi do ich przemieszczenia do jądra komórkowego, gdzie regulują transkrypcję licznych genów związanych z odpowiedzią na zakażenie.

mórki bakterii z receptorem komórki gospodarza (11) bądź jej stymulacji przez inne czynniki, jak na przykład wirusy (np. human immunodeficiency virus-1, HIV-1), niektóre cytokiny prozapalne (np. IL-1β, TNF-α) czy mitogeny, które aktywują receptory BCR i TCR. W wyniku takiego oddziaływania dochodzi do aktywacji kompleksu kinaz IKK (IκB kinase), a następnie fosforylacji i ubikwitynacji IκB. Dzięki tym procesom inhibitor ulega proteasomalnej degradacji, a uwolniony dimer NF-κB z odsłoniętą sekwencją

sygnalną NLS (nuclear localization signal) przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie aktywuje transkrypcję genów kodujących cytokiny, molekuły adhezyjne, enzymy i inne ważne biologicznie molekuły.

Pozostałe drogi aktywacji czynnika NF-κB to droga: (i) alternatywna, stymulowana przez receptory TNF, pełniąca kluczową rolę w rozwoju narządów limfatycznych i aktywacji limfocytów oraz (ii) indukowana przez czynniki uszkadzające DNA. Przebieg każdej z nich różni się od mechanizmu klasycznej aktywacji NF-κB.

Jak opisano powyżej, NF-κB odgrywa rolę w powstawaniu zapalenia, z czym wiąże się fakt, iż większość genów kodujących molekuły związane z tym procesem (np. IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8, receptory cytokin) zawiera w obrębie sekwencji promotorowych miejsca wiązania tego czynnika (tzw. κB sites). Na tej podstawie Boulanger i wsp. (2) wysunęli hipotezę, iż zwiększony poziom aktywacji NF-κB w komórkach gruczołu mlekowego przyczynia się do procesów zapalnych związanych z aktywacją neutrofili. Ustalono, iż wysoki poziom dimerów p65-p50 i p65-p65 NF-κB w wyizolowanych z mleka krowiego komórkach jest charakterystyczny dla ostrej postaci *mastitis*, wywoływanej głównie przez *Staphylococcus aureus*, w której liczba komórek somatycznych w mleku (somatic cell count, SCC) wynosi powyżej 10^7 komórek/ml. Jednocześnie zaobserwowano znaczny wzrost zawartości procentowej PMNs (polymorphonuclear cells), których przeżywalność w mleku krów z *mastitis* jest zwiększona (6), a także duży spadek procentowego udziału limfocytów i makrofagów w badanych próbkach mleka w porównaniu z próbkami uzyskanymi od krów zdrowych. Ponadto w przypadku przewlekłego zapalenia gruczołu mlekowego spowodowanego zakażeniem *Staphylococcus aureus* i/lub *Streptococcus agalactiae* stwierdzono różne poziomy aktywacji badanego czynnika transkrypcyjnego (heterodimery p65--p50): od niskiego do wysokiego, w odróżnieniu od komórek izolowanych z mleka krów zdrowych, w których poziom NF-κB był niewykrywalny. Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, iż NF-κB odgrywa istotną rolę w patogenezie *mastitis*. Warto podkreślić udział homodimerów p65 we wspomnianych procesach, gdyż odgrywają one rolę w przebiegu infekcji bakteryjnych związanych z aktywacją PMNs poprzez aktywację transkrypcji genów kodujących IL-8 i ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1). Molekuły te z kolei zaangażowane są w proces diapedezy i transmigracji PMNs (16). Ponadto stwierdzono istnienie korelacji pomiędzy poziomem aktywacji NF-κB i GM-CSF (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor), który opóźnia apoptozę PMNs oraz IL-8, chemokiny, odgrywającej rolę w migracji PMNs do miejsca reakcji zapalnej. Obecność hipotetycznych sekwencji κB w bydlęcym promotorze genu kodującego IL-8, który wiąże specyficznie indukowany przez TNF-α heterodimer p65-p50, wykazali Fitzgerald i wsp. (7) na podstawie badań wykonanych *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowej nabłonka gruczołu mlekowego bydła BME-UV, w których użyto IL-8 jako zastępczego markera aktywacji NF-κB. Udowodniono także zdolność TNF-α, silnie działającej cytokiny prozapalnej, do zwiększenia aktywności homodimerów p65 w badanych komórkach. W związku z zależnością ekspresji genów kodujących IL-8 i inne molekuły, uczestniczące w procesach zapalnych, od aktywacji NF-κB, Boutet i wsp. (3) zbadali wpływ prolaktyny bydlęcej (PRL) na tę aktywację w komórkach nabłonkowych gruczołu mlekowego bydła (linia MAC-T). Badania te dowiodły, iż PRL znacząco wpływa na wzrost ekspresji mRNA IL-1β, IL-6 i TNF-α – aktywatorów PMNs oraz IL-8 i GM-CSF. Na tej podstawie stwierdzono, iż PRL indukuje odpowiedź zapalną w komórkach nabłonkowych gruczołu mlekowego poprzez aktywację NF-κB i jest wysoce prawdopodobne, iż odgrywa ona rolę w modulacji tej odpowiedzi w przebiegu przewlekłego *mastitis*. Zaobserwowano również, że poziom PRL w próbkach mleka uzyskanych z ćwiartek krów z przewlekłą postacią *mastitis* spowodowaną głównie przez *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus uberis* (SCC > 10^6/ml) wykazuje pozytywną korelację z liczbą komórek somatycznych i liczbą PMNs obecną w próbkach mleka. Warto podkreślić, iż *Staphylococcus aureus* często stanowi przyczynę występowania przewlekłej postaci zapalenia gruczołu mlekowego, w przeciwieństwie do Gram-ujemnych coliforms, które odpowiadają za ostre stany zapalne gruczołu mlekowego z towarzyszącymi im objawami klinicznymi. Wspomniane patogeny, a także wiele innych, oddziaływują z receptorami na powierzchni makrofagów, komórek dendrytycznych czy komórek nabłonka, zwanymi TLRs (toll-like receptors), biorącymi udział w rozpoznawaniu molekularnych wzorców patogenności drobnoustrojów, tzw. PAMPs (pathogen – associated molecular patterns). Do tych ostatnich zalicza się, między innymi, LPS i LTA (kwas lipotejchojowy), elementy ściany komórkowej bakterii, które w wyniku takiego rozpoznania pobudzają szlaki komórkowe, co skutkuje aktywacją NF-κB. Badania, w których stymulowano komórki nabłonkowe gruczołu mlekowego krowy (linie bMEC i MAC-T) przy użyciu LPS bakterii Gram-ujemnych, wykazały relatywnie niewielki wzrost ekspresji p65 i p50 w analizowanych komórkach, jednak zaobserwowano translokację aktywowanej podjednostki p50 do jądra komórkowego w komórkach linii bMEC stymulowanych LPS. Wyjaśniono ponadto, iż ograniczona odpowiedź na LTA ze strony cytokin, takich jak IL-1β, IL-8 czy TNF-α, tłumaczy występowanie przewlekłego przebiegu zapalenia wywołanego przez bakterie Gram-dodatnie (18). Podobnie zaobserwowano w badaniach *in vitro*, iż *Staphylococcus aureus*, a także antygen tego patogenu, LTA, w komórkach linii bydlęcej nabłonka gruczołu mlekowego pbMEC, w przeciwieństwie do *Escherichia coli* i LPS, jednocześnie osłabia reakcję

prozapalną oraz ekspresję IL-8 i TNF-α. W doświadczeniu tym wykorzystano inaktywowane termicznie bakterie i wykazano brak aktywacji NF-κB przez *Staphylococcus aureus* i LTA w pbMEC, a także bardzo słabą indukcję syntezy TNF-α i IL-8. Stwierdzono, iż zjawiska te nie są spowodowane osłabionym wiązaniem ligandów do TLR, ale prawdopodobnie istnieniem komórkowo-specyficznego mechanizmu blokującego TLR-zależną aktywację NF-κB. Inaktywowane cieplnie bakterie, zarówno *Staphylococcus aureus*, jak i *E. coli*, aktywują bowiem bydlęce receptory TLR2 i TLR4, i w konsekwencji badany czynnik transkrypcyjny tak samo silnie. Dowiedziono tego w pracach wykonanych na modelu badawczym, w którym odtworzono system transdukcji TLR w komórkach HEK293 (human embryonic kidney 293) (19).

Jak wskazuje piśmiennictwo (3, 7, 18, 19), komórki nabłonka gruczołu mlekowego odgrywają znaczącą rolę w odpowiedzi immunologicznej podczas *mastitis*. Odpowiedź ta jednak nie jest ograniczona do jednego typu komórek. Ważnym dla takich procesów obszarem jest śródbłonek naczyniowy, w którym następuje indukowana przez LPS odpowiedź na różne zakażenia i gdzie istnieje możliwość wystąpienia szoku septycznego. Cates i wsp. (4) wykazali w badaniach *in vitro*, iż bydlęce cząsteczki adaptorowe MyD88 (myeloid differentiation-factor 88) i TIRAP (TIR-domain containing adaptor protein) odpowiedzialne są za transdukcję sygnałów związanych z aktywacją NF-κB w bydlęcych komórkach śródbłonka, indukowaną przez LPS na skutek oddziaływania tej endotoksyny z TLR-4. Wykazano również, iż TIRAP promuje apoptozę indukowaną przez LPS w komórkach śródbłonka. Oprócz udziału w mechanizmach odpowiedzi na zakażenia, śródbłonek naczyniowy uczestniczy również w internalizacji *Staphylococcus aureus*. Nasilenie tego procesu z udziałem komórek śródbłonka jest bowiem spowodowane jego aktywacją przez IL-1β i TNF-α (15).

Badania nad *mastitis* przeprowadza się także *in vivo*, na modelu mysim. Nieinwazyjna metoda badawcza, w której użyto transgenicznych myszy, wykazujących ekspresję lucyferazy pod kontrolą czynnika NF-κB, została zaproponowana przez Notebaerd i wsp. (13). Technika ta pozwala na monitorowanie zmian aktywacji NF-κB w gruczole sutkowym w czasie rzeczywistym i daje możliwość czasowej i przestrzennej analizy tego czynnika. Światło generowane w przebiegu doświadczenia po iniekcji D-lucyferyny wykazuje bezpośrednią korelację z ilością transkrypcyjnie aktywnego czynnika NF-κB. Zwierzęta doświadczalne uzyskano poprzez wprowadzenie plazmidu 3x-κB-luc (konstrukt DNA zawierający 3 miejsca NF-κB z promotora lekkiego łańcucha κ Ig, sprzężonego z genem kodującym lucyferazę świetlika) do przedjądrzy zygot. W doświadczeniu zbadano aktywność NF-κB podczas indukowanego zakażenia gruczołu sutkowego *E. coli* i zaobserwowano znaczną różnicę w intensywności luminescencji u zwierząt zainfekowanych *E. coli* w porównaniu z osobnikami kontrolnymi. Dodatkowo autorzy wykazali kluczową rolę komórek nabłonka gruczołu sutkowego w mechanizmach odpowiedzi immunologicznej związanej z aktywacją badanego czynnika transkrypcyjnego, która może być uznana za silną na wczesnym etapie, kiedy napływ neutrofili do gruczołu sutkowego jest jeszcze minimalny, w porównaniu do odpowiedzi, jaka była określana w badaniach *in vitro* oraz *ex vivo*, w momencie, gdy infekcja jest już ustalona. Analiza immunohistochemiczna przeprowadzona *post mortem* wykazała aktywność podjednostki p65, przy czym nie wykryto aktywności podjednostki p50, co wskazuje na udział homodimerów p65 w zakażeniu *E. coli*. Inne badania przeprowadzone przez Notebaert i wsp. (14) z użyciem myszy potwierdziły, iż wzrost poziomu cytokin TNF-α i IL-6 podczas zakażenia gruczołu sutkowego *E. coli* związany jest z miejscowym wzrostem aktywności NF-κB. Podobnie, zwiększona koncentracja IL-1 po inokulacji zwierząt doświadczalnych patogenem koreluje z aktywnością NF-κB, który powoduje wzrost ekspresji genu prekursora IL-1β, niezależnej od kaspazy 1, uczestniczącej w dojrzewaniu cytokin i indukcji apoptozy.

Inne badania, dotyczące apoptozy, przeprowadzono z wykorzystaniem myszy transgenicznych, wykazujących specyficzną aktywację NF-κB w komórkach nabłonka gruczołu sutkowego dzięki ekspresji konstytutywnie aktywnej formy IKK2 (5). Dowiedziono, iż podczas inwolucji gruczołu sutkowego aktywacja taka odpowiada za bardziej gwałtowny spadek produkcji mleka, a także wpływa na aktywność kaspazy-3, która jest wskaźnikiem apoptozy. Podobny efekt zaobserwowano podczas laktacji. Ponadto wprowadzenie LPS *E. coli* do gruczołu sutkowego myszy w czasie laktacji powodowało aktywację NF-κB i zmniejszone wytwarzanie mleka.

Proces aktywacji omawianego czynnika transkrypcyjnego zbadano również w odniesieniu do terapii *mastitis* u krów. Komine i wsp. (10) na podstawie badań przeprowadzonych na linii komórkowej BMEC ustalili, iż połączenie terapii antybiotykowej z zastosowaniem laktoferryny daje zarówno efekt antybakteryjny (antybiotyki), jak i przeciwzapalny, dzięki laktoferrynie, która ma zdolność inhibicji aktywacji NF-κB w przebiegu *mastitis* spowodowanym zakażeniem *Staphylococcus aureus* w trakcie zasuszania gruczołu mlekowego krów.

Podsumowując, przedstawione w niniejszej pracy piśmiennictwo pozwala stwierdzić, iż czynnik transkrypcyjny NF-κB jest kluczowym regulatorem procesów fizjologicznych, zachodzących w gruczole mlekowym oraz odpowiedzi zapalnej w przebiegu *mastitis*. W związku z powyższym badania nad NF-κB, jako elementem interakcji patogen–gospodarz, mają szansę przyczynić się do rozwoju skutecznej kontroli bardzo istotnych z punktu widzenia medycyny weterynaryjnej zakażeń gruczołu mlekowego.

Piśmiennictwo

1. *Baeuerle P. A., Baltimore D.*: NF-κB: Ten years after. Cell 1996, 87, 13-20.
2. *Boulanger D., Bureau F., Mélotte D., Mainil J., Lekeux P.*: Increased nuclear factor κB activity in milk cells of mastitis-affected cows. J. Dairy Sci. 2003, 86, 1259-1267.
3. *Boutet P., Sulon J., Closset R., Detilleux J., Beckers J. F., Bureau F., Lekeux P.*: Prolactin-induced activation of nuclear factor κB in bovine mammary epithelial cells: role in chronic mastitis. J. Dairy Sci. 2007, 90, 155-164.
4. *Cates E. A., Connor E. E., Mosser D. M., Bannerman D. D.*: Functional characterization of bovine TIRAP and MyD88 in mediating bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial NF-κB activation and apoptosis. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 2009, 32, 477-490.
5. *Connelly L., Barham W., Pigg R., Saint-Jean L., Sherrill T., Cheng D. S., Chodosh L. A., Blackwell T. S., Yull F. E.*: Activation od nuclear factor-kappa B in mammary epithelium promotes milk loss during mammary development and infection. J. Cell. Physiol. 2010, 222, 73-81.
6. *Cywińska A., Baś M., Karpiuk O., Krzyżowska M., Rzewuska M., Schollenberger A., Niemiałtowski M.*: Immunobiology of bovine mammary gland: apoptosis of somatic cells in milk during naturally occurring mastitis. Pol. J. Vet. Sci. 2006, 9, 63-70.
7. *Fitzgerald D. C., Meade K. G., McEvoy A. N., Lillis L., Murphy E. P., MacHugh D. E., Baird A. W.*: Tumour necrosis factor-α (TNF-α) increases nuclear factor κB (NFκB) activity in and interleukin-8 (IL-8) release from bovine mammary epithelial cells. Vet. Immunol. Immunopathol. 2007, 116, 59-68.
8. *Foster T. J.*: Immune evasion by staphylococci. Nat. Rev. Microbiol. 2005, 12, 948-958.
9. *Goff J. P., Horst R. L.*: Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. J. Dairy Sci. 1997, 80, 1260-1268.
10. *Komine Y., Komine K., Kai K., Itagaki M., Kuroishi T., Aso H., Obara Y., Kumagai K.*: Effect of combination therapy with lactoferrin and antibiotics against staphylococcal mastitis on drying cows. J. Vet. Med. Sci. 2006, 68, 205-211.
11. *Krappmann D., Wegener E., Sunami Y., Esen M., Thiel A., Mordmuller B., Scheidereit C.*: The IκB kinase complex and NF-κB act as master regulators of lipopolysaccharide – induced gene expression and control subordinate activation of AP-1. Mol. Cell Biol. 2004, 24, 6488-6500.
12. *Niemiałtowski M., Schollenberger A., Kluciński W.*: Mucosal immunity and the bovine entero-mammary link: evolutionary established dialogue between antigen and arms of the immune system, [w:] Holzapfel W., Naughton P. (red.): Microbial ecology of the growing animal. Elsevier Press 2004, t. III, 293-313.
13. *Notebaert S., Carlsen H., Janssen D., Vandenabeele P., Blomhoff R., Meyer E.*: In vivo imaging of NF-κB activity during Escherichia coli--induced mammary gland infection. Cell. Microbiol. 2008, 10, 1249-1258.
14. *Notebaert S., Demon D., Vanden Berghe T., Vandenabeele P., Meyer E.*: Inflammatory mediators in Escherichia coli-induced mastitis in mice. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 2008, 31, 551-565.
15. *Oviedo-Boyso J., Barriga-Rivera J. G., Valdez-Alarcün J. J., Bravo-Patiño A., Cárabez-Trejo A., Cajero-Juárez M., Baizabal-Aguirre V. M.*: Internalization of Staphylococcus aureus by bovine endothelial cells is associated with the activity state of NF-κB and modulated by the pro-inflammatory cytokines TNF-α and IL-1β. Scand. J. Immunol. 2008, 67, 169-176.
16. *Sandersen C., Bureau F., Turlej R., Fiévez L., Dogné S., Kirschvink N., Lekeux P.*: p65 Homodimer activity in distal airway cells determines lung dysfunction in equine heaves. Vet. Immunol. Immunopathol. 2001, 80, 315-326.
17. *Sen R., Baltimore D.*: Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. Cell 1986, 46, 705-716.
18. *Strandberg Y., Gray C., Vuocolo T., Donaldson L., Broadway M., Tellam R.*: Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. Cytokine 2005, 31, 72-86.
19. *Yang W., Zerbe H., Petzl W., Brunner R. M., Günther J., Draing C., von Aulock S., Schuberth H. J., Seyfert H. M.*: Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from Staphylococcus aureus and E. coli, but S. aureus fails to both activate NF-κB in mammary epithelial cells and to quickly induce TNFα and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. Mol. Immunol. 2008, 45, 1385-1397.

Adres autora: mgr inż. Justyna Struzik, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: justyna.struzik@interia.pl