

The cause of increased susceptibility of cow mammary gland to infections during the dry period

Markiewicz H., Gajewski Z., Department of Large Animals Diseases with Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

This article aims at the presentation of conditions during the most bovine mastitis control programs. The dry period in dairy cows is an optimal time to treat subclinical and chronic forms of mastitis. This is effected by treating each quarter of the udder with long-acting, broad-spectrum antibiotic preparation right after the last milking of a lactation. The strategy is highly effective against common contagious bacterial mastitis. However, this is also the time for the establishment of highest number of new mammary gland infections. Udder sensitivity to new infections increases in the early phase of involution – in the first week of dry period and during the period of colostragenesis. The presence of a keratin plug in the teat canal and a high concentration of lactoferrin are major protective factors which are guarding mammary gland during the dry period. An acceleration of first phase of involution is associated with an increase of innate immunity mechanisms in the udder, which might be essential for the prevention of new infections at the beginning of the dry period. There is a possibility however, that sterilizing effect of antibiotic treatment during the dry period may, at the same time, increase udder sensitivity to other infections. The drying-off should be a period of special care about hygiene of environment inhabited by animals, since the antibiotic shield protects the udder against new infections only in the initial phase of involution and does not during the pre-calving period.

Keywords: dairy cows, dry period, udder infections, control programs.

Okres zasuszenia u krów mlecznych to optymalny czas na leczenie podklinicznych i przewlekłych postaci zapaleń wymienia. W tym czasie dochodzi także do wystąpienia największej liczby przypadków nowych zakażeń gruczołu mlekowego, a głównymi patogenami wywołującymi zakażenia w tym okresie są bakterie środowiskowe. Wykazano, że 52,6% przypadków *mastitis* w pierwszych 100 dniach laktacji, których czynnikiem etiologicznym były pałeczki coliform, miało swój początek w okresie zasuszenia (1). Główną rolę w ochronie wymienia krów przed zakażeniami w zasuszeniu odgrywa odporność nieswoista. Pomimo tej ochrony, wrażliwość gruczołu mlekowego na nowe zakażenia zwiększa się we wczesnej fazie inwolucji oraz w okresie kolostroogenezy i laktogenezy (2, 3).

Okres zasuszenia, trwający zwykle 6 tygodni, nie jest jednorodny. Faza pierwsza tego okresu to tzw. wczesna aktywna

Przyczyny podatności gruczołu mlekowego krów na zakażenia w okresie zasuszenia

Hanna Markiewicz, Zdzisław Gajewski

z Katedry Chorób Dużych Zwierząt z Kliniką Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

inwolucja. Nabłonek wydzielniczy ulega w tym okresie regresji i zmniejsza się aktywność sekrecyjna pęcherzyków wydzielniczych. W tym czasie w kanale strzykowym formuje się czop keratynowy. Druga faza to stan równowagi. W wymieniu nie ma aktywności sekrecyjnej i gruczoł nie zmienia się po inwolucji. Faza trzecia to podjęcie aktywności wydzielniczej i synteza siary (4, 5). Inwolucja gruczołu mlekowego u bydła jest inwolucją regeneracyjną, polegającą na wymianie ok. 80% komórek nabłonkowych (6).

Jednym z czynników aktywnej inwolucji gruczołu mlekowego jest zastój mleka, który wywołuje negatywne sprzężenie zwrotne w regulatorowych mechanizmach przyspieszających zasuszenie i obkurczenie tkanki wydzielniczej. Zastój mleka może być lokalnym sygnałem indukującym syntezę i wydzielanie serotoniny przez komórki nabłonkowe gruczołu mlekowego (mammary epithelial cells – MEC), co wydaje się potencjalnym czynnikiem hamującym sekrecję mleka (7). Największa akumulacja wydzieliny ma miejsce w 2–3 dniu po zaprzestaniu doju. Wzrost ciśnienia w pęcherzykach wydzielniczych zapoczątkowuje proces aktywnej inwolucji. Podwyższone ciśnienie w gruczole mlekowym wiąże się często z wyciekaniem mleka, co jest jednym z czynników sprzyjających nowym zakażeniom. Inwolucja wymienia u krów związana jest z odpowiedzią zapalną, którą charakteryzuje aktywacja gruczołowego układu immunologicznego przyspieszającego apoptozę komórek nabłonkowych i przebudowę tkanki gruczołowej. Proces aktywnej inwolucji związany jest z obrzękiem, przekrwieniem zatoki strzykowej i gruczołowej, przewodów i pęcherzyków wydzielniczych oraz ze zmianą składu wydzieliny gruczołu mlekowego i regresją tkanki sekrecyjnej (4, 8, 9). W początkowej fazie aktywnej inwolucji, w wydzielniczych komórkach nabłonka pojawiają się lizosomy. Biorą one udział w autofagocytzie komórek sekrecyjnych. Degeneracja komórek prowadzi do utraty kontaktu między nimi i błoną podstawną. Zmiany fenotypowe komórek w pierwszej fazie inwolucji dotyczą przerwania połączeń ścisłych (tight junctions – TJ) między komórkami nabłonkowymi (9). Połączenia

te tracą szczelność po 18–21 godzinach od zaprzestania doju i akumulacji mleka w wymieniu. Połączenia ściśle utworzone są przez transmembranowe białka – kładyny i okładyny. Zmiany w ich integralności wiążą się ze zmniejszonym przepływem krwi przez gruczoł mlekowy i zahamowaniem syntezy mleka. Zakłócenie funkcji okładyny może odgrywać kluczową rolę w zapoczątkowaniu apoptozy i sygnalizacji śmierci komórki, podczas gdy kładyny utrzymują funkcję barierową (10). Gromadzenie mleka w pęcherzykach wydzielniczych zapoczątkowuje apoptozę typu I. Komórki nabłonkowe ulegają też autofagii – programowanej śmierci komórki typu II. Są one również usuwane na drodze fagocytoty (4).

Proces aktywnej inwolucji gruczołu mlekowego może być wywołany przez plazminę, która uwalnia peptydy z N-terminalnej części β -kazeiny. Obecny w mleku plazminogen ulega konwersji do plazminy przy udziale aktywatora plazminogenu. Aktywność plazminy wzrasta w gruczole mlekowym stopniowo w ciągu kolejnych 13 dni po zaprzestaniu doju (11). Równocześnie zwiększa się aktywność metaloproteinaz macierzy (MMP). W 7 dniu zasuszenia obserwowano wzrost aktywności MMP-9, której głównym źródłem są neutrofile, również zwiększające liczebność w tym okresie (12, 13).

Mechanizmem chroniącym gruczoł mlekowy przed zakażeniem w okresie zasuszenia jest obecność czopu keratynowego w kanale strzykowym (14). Właściwości keratyny chronią zatokę strzykową przed penetracją patogenów. Dotyczy to zarówno działania bakteriostatycznego, bakteriobójczego, jak i mechanicznego. Na powierzchni keratyny dochodzi do adsorpcji bakterii, które są następnie usuwane na drodze złuszczenia zrogowaciałych komórek w czasie doju. Skład keratyny jest różny u krów w zasuszeniu i w laktacji. Stężenie krótko- i średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych jest trzykrotnie niższe, natomiast stężenie kwasu linolowego i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych jest dwukrotnie wyższe u krów zasuszonych, w porównaniu do krów w laktacji. Krowy, których keratyna zawiera wysokie

stężenie kwasów laurynowego, mirystynowego, palmitooleinowego są mniej podatne na zakażenie niż te, które mają wysoką koncentrację kwasów stearynowego, linolowego i oleinowego. Warstwa keratyny zwierząt podatnych na zakażenia jest cieńsza, o mniejszej gęstości, jest też słabiej związana z podłożem. Skład keratyny podlega dziedziczeniu. Keratyna zawiera także białka kationowe, które wiążą się ze ścianą komórkową *Streptococcus agalactiae* i *Staphylococcus aureus*, co zakłóca mechanizmy osmoregulacyjne, powodując destrukcję tych drobnoustrojów. Brak wytworzonego czopu keratynowego jest istotnym czynnikiem sprzyjającym nowym zakażeniom. Zaburzenia dotyczące jego formowania obserwuje się przede wszystkim u krów o wydajności mlecznej w momencie zasuszenia >12,5 litra/dobę (15, 16, 17).

Wzrost liczby nowych zakażeń na początku okresu zasuszenia związany jest też z populacją bakterii zasiedlających dystalną część strzyków. Po zaprzestaniu kąpieli strzyków (dippingu) stosowanej w okresie laktacji zwiększa się ilość bakterii na skórze strzyków.

W pierwszych dniach po zaprzestaniu doju liczba neutrofilów, makrofagów i limfocytów w wymieniu jest niska. Również stężenie laktoferyny i immunoglobulin nie jest wystarczające do skutecznej ochrony gruczołu mlekowego przed nowymi zakażeniami w ciągu pierwszych trzech dni okresu zasuszenia. U krów, którym w ostatnim tygodniu laktacji zmieniono harmonogram doju, obserwowano wzrost stężenia laktoferyny w porównaniu do krów dojnych regularnie. Wiązało się to z większą ochroną gruczołu mlekowego przed zakażeniami w pierwszych dniach zasuszenia (18). Laktoferyna nie jest białkiem specyficznym dla gruczołu mlekowego. Jest ona również obecna w wydzielinie komórek nabłonkowych błon śluzowych. Laktoferyna jest też składnikiem ziarnistości wtórnych neutrofilów. Wzrost liczby lizosomów w komórkach wydzielniczych w fazie aktywnej inwolucji jest źródłem laktoferyny. Łączy się ona również ze specyficznymi receptorami na makrofagach i limfocytach. Obecność receptorów dla laktoferyny na tych komórkach wskazuje, że może ona kontrolować napływ komórek do gruczołu mlekowego podczas inwolucji. Nowym zakażeniom, oprócz niskiej liczby leukocytów w wydzielinie gruczołu mlekowego, sprzyja też niskie stężenie laktoferyny, co znajduje odbicie w wysokim stosunku cytrynian: laktoferyna (19). Cytrynian jest buforem mleka. Jest on obecny w fazie wodnej mleka, jako cytrynian wapnia, potasu i magnezu. Nabłonek gruczołu mlekowego jest nieprzepuszczalny dla cytrynianu. Przypuszcza się, że cytrynian jest syntetyzowany w komórkach sekrecyjnych

gruczołu mlekowego i uwalniany do mleka na drodze egzocytozy pęcherzyków sekrecyjnych aparatu Golgiego (20, 21).

Niskiej liczbie leukocytów w mleku (wydzielinie) w pierwszych dniach zasuszenia towarzyszy ich osłabiona aktywność fagocytarna, będąca wynikiem nie tylko fagocytowania kuleczek tłuszczu, micelli kazeiny i kruszywa komórkowego, ale również niskiego stężenia składników dopełniacza. Zaangażowanie komórek żernych w fagocytowanie rozpadłych komórek, białek mleka i kropli tłuszczu daje też efekt „przeładowania”, przez co ich zdolność do rozpoznawania, fagocytozy i zabijania patogenów się zmniejsza. Równocześnie ma miejsce zwiększona translokacja IgG₁ z krwi do gruczołu mlekowego. Wysokie stężenie kompleksów IgG₁ w wydzielinie gruczołu mlekowego powoduje blokowanie receptorów Fc neutrofilów, co prowadzi do zmniejszenia ich zdolności do fagocytozy opsonizowanych bakterii (22). Czynniki te wpływają na wzrost wrażliwości gruczołu mlekowego na zakażenia we wczesnym okresie zasuszenia. Podatność na nowe zakażenia na początku okresu zasuszenia może być związana bardziej ze zmienioną aktywnością neutrofilów niż szybkością ich napływu do gruczołu mlekowego.

W okresie aktywnej inwolucji zmniejsza się synteza głównych składników mleka: tłuszczu, laktozy, kazeiny, α i β – laktooglobulin, wzrasta natomiast koncentracja białka całkowitego. Między 3 a 7 dniem inwolucji wzrasta stężenie immunoglobulin i surowiczey albuminy. Wzrost stężenia albuminy wiąże się ze zwiększoną przepuszczalnością komórek sekrecyjnych, co umożliwia jej bierną dyfuzję. Większość immunoglobulin transportowana jest do gruczołu mlekowego drogą receptorową wewnątrzkomórkową. Na komórkach śródbłonna obecne są receptory dla fragmentów Fc immunoglobulin. W transporcie IgG wykorzystywany jest mechanizm transcytozy (23).

Już w pierwszym dniu inwolucji neutrofile przyciągane są do gruczołu mlekowego, jednak ich wynacznienie do tkanki ulegającej regresji ma miejsce dopiero ok. 3 dnia. Uwalnianie w tym czasie czynników przeciwzapalnych przez komórki nabłonkowe hamuje napływ neutrofilów, co zmniejsza odpowiedź zapalną (4). W ciągu pierwszych 3–7 dni po ostatnim doju dominują neutrofile. Później głównymi komórkami stają się makrofagi. Począwszy od 6. dnia zasuszenia, obserwuje się zwiększony napływ leukocytów do gruczołu mlekowego, aby w 8. dniu osiągnęły one poziom chroniący przed zakażeniem ($2-5 \times 10^6$ /ml). Neutrofile mogą zabijać drobnoustroje również na drodze zewnątrzkomórkowej, formując zewnątrzkomórkową sieć neutrofilów (neutrophil extracellular traps – NET).

Tworzenie tej sieci jest stymulowane przez kontakt z patogenami, jak również przez endotoksynę, IL-8 czy TNF. Mechanizm ten występuje także w gruczole mlekowym (24, 25).

W początkowym okresie inwolucji ma miejsce zwiększona apoptoza komórek nabłonkowych pęcherzyków wydzielniczych. Skutkiem przerwania szczelności połączeń między komórkami nabłonka jest wzrost stężenia elektrolitów – sodu i chlorków oraz znaczny napływ leukocytów do gruczołu mlekowego. W fazie tej aktywizowane są składowe odporności nieswoistej (albumina, laktoferyna; 5).

Między 14. a 30. dniem inwolucji wzrasta liczba limfocytów w wydzielinie wymienia. Populacja limfocytów T i B obecnych w gruczole mlekowym w trakcie inwolucji odpowiada proporcji tych komórek we krwi. Limfocyty izolowane z wymienia w mniejszym stopniu odpowiadają na mitogeny, w porównaniu do limfocytów izolowanych z krwi, co wskazuje, że zostały one poddane stymulacji w gruczole mlekowym (9). W zależności od fazy laktacji udział procentowy poszczególnych subpopulacji limfocytów ulega dużym wahaniom. Te fizjologiczne zmiany (naturalna immunosupresja) warunkują zwiększoną wrażliwość gruczołu mlekowego na zakażenia w okresie wczesnej inwolucji oraz w okresie okołoporodowym (26). Okres aktywnej inwolucji gruczołu mlekowego trwa do 21–30 dnia po zaprzestaniu doju (8). Zwiększone ryzyko zakażeń w pierwszej fazie inwolucji wiąże się ze zbyt wolną aktywacją składowych odporności nieswoistej.

Kolejna faza to tzw. ustabilizowana inwolucja (steady state involution). W okresie tym gruczoł mlekowy jest odporny na nowe zakażenia, gdyż stężenie laktoferyny jest wysokie, a tym samym wskaźnik cytrynian: laktoferyna jest niski. Laktoferyna działa poprzez sekwestrację jonów żelaza potrzebnych do wzrostu bakterii lub przez bezpośrednią interakcję regionu kationowego z komponentami bakteryjnymi. Wysokie jest również stężenie immunoglobulin. Sprawia to, że wydzielina jest środowiskiem niekorzystnym dla wzrostu bakterii. Komórkami dominującymi są makrofagi i limfocyty, obniżeniu ulega natomiast liczba neutrofilów (9, 20).

W okresie inwolucji obniżeniu ulega stężenie cytrynianu, a wzrasta wodoro-węglanów. Jest to środowisko sprzyjające aktywności laktoferyny, tworzącej chelaty z jonami żelaza. Laktoferyna cechuje się działaniem bakteriostatycznym oraz antyoksydacyjnym, z racji ochrony przed wolnymi rodnikami powstającymi w reakcjach katalizowanych przez jony żelaza. W wydzielinie zasuszonego gruczołu mlekowego stężenie laktoferyny osiąga wartość do 100 mg/ml, podczas gdy w mleku

koncentracja jej nie przekracza 200 µg/ml. Ekspresja laktoferyny jest odwrotnie proporcjonalna do rozwoju pęcherzyków wydzielniczych. Stężenie laktoferyny jest wystarczające dla zahamowania wzrostu drobnoustrojów tylko w fazie ustabilizowanej inwolucji (9, 27, 28). Jony żelaza związane są też przez transferynę. Nie jest ona syntetyzowana przez komórki nabłonkowe, ale na drodze transcytozy transportowana z krwi (19). Brak dostępności jonów żelaza w wydzielinie gruczołu mlekowego hamuje wzrost *Escherichii coli* oraz *Staphylococcus aureus*. Środowisko takie nie hamuje jednak wzrostu paciorkowców.

W drugiej fazie inwolucji struktury zrazikowo-pęcherzykowe są zatarte przez działanie proteaz degradujących błonę podstawną i macierz zewnątrzkomórkową. Stan ten jest związany z utratą zdolności produkcji i sekrecji mleka (wydzielina surowiczopodobna, bogata w leukocyty). Okres ten nie ma zdefiniowanego początku i końca. Jest to okres pełnej inwolucji gruczołu mlekowego. W okresie inwolucji w wydzielinie wymienia wzrasta także istotnie stężenie dopełniacza, w porównaniu z mlekiem (29).

Aktywność bakteriobójcza i bakteriostatyczna wydzieliny gruczołu mlekowego podczas inwolucji może być udziałem nie tylko immunoglobulin i laktoferyny, ale także reaktywnych form tlenu. Uważa się, że laktoperoksydaza, oksydaza ksantynowa i tlenek azotu mogą być składowymi odporności nieswoistej wymienia. Środowisko wymienia (niskie ciśnienie tlenu i pH < 7) jest korzystne dla aktywności oksydazy ksantynowej (30, 31). Inwolucji towarzyszy zwiększona apoptoza, podczas której ma miejsce wzrost aktywności oksydazy ksantynowej. Wzrasta też stężenie kwasu moczowego (8).

Trzecia faza inwolucji wymienia (kolostrogenesa i laktogenez), cechuje się gwałtownym różnicowaniem i rozwojem komórek sekrecyjnych mięszu gruczołu i początkiem syntezy siary, co wiąże się ze zwiększonym zapotrzebowaniem na tlen, a konsekwencją jest wzrost produkcji wolnych rodników (3). Faza ta rozpoczyna się około 20–15 dni przed porodem. Około 2 tygodni przed porodem zmniejsza się liczba leukocytów w wydzielinie gruczołu mlekowego, a dominującymi komórkami stają się makrofagi. Równocześnie zwiększa się synteza immunoglobulin, głównie klasy IgG₁. W okresie tym cytrynian tworzy chelaty z jonami żelaza, które w tej formie dostępne są dla bakterii. Proporcja cytrynianu do laktoferyny determinuje stopień zahamowania wzrostu bakterii (20).

W okresie przebudowy i kolostrogenesy następuje regeneracja i różnicowanie komórek sekrecyjnych. Ponownie zwiększa się wrażliwość gruczołu mlekowego na

nowe zakażenia, gdyż stężenie laktoferyny obniża się, a iloraz cytrynian: laktoferyna wzrasta około 100-krotnie. W tygodniu poprzedzającym poród wzrasta zawartość tłuszczu, kazeiny i laktozy w wydzielinie, co sprzyja zmniejszeniu aktywności fagocytarnej komórek żernych, których liczba zmniejsza się w tym okresie. Zmniejszenie liczby i aktywności dotyczy zarówno neutrofilów, jak i makrofagów (28). W miarę trwania inwolucji wzrasta stopniowo aktywność enzymu lizosomalnego N-acetylo-β-D-glukozaminidazy. Jest to wskaźnikiem zmian zachodzących podczas przebudowy tkanki gruczołowej. Głównym źródłem tego enzymu w mleku są makrofagi i neutrofile (32).

Zwiększenie liczby nowych zakażeń tuż przed porodem może być związane z supresyjnym oddziaływaniem wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) na funkcje neutrofilu. Wykazano bowiem zależność między stężeniem WKT przed porodem a aktywnością mieloperoksydazy (33).

Przedstawione przyczyny wzrostu liczby nowych zakażeń gruczołu mlekowego w okresie zasuszenia jednoznacznie wskazują, że powinien to być okres szczególnej dbałości o higienę środowiska, w którym przebywają zwierzęta oraz zapewnienie im dobrostanu. Zasuszenie krów w osłonie antybiotykowej chroni zwierzęta przed nowymi zakażeniami tylko w początkowej fazie inwolucji, nie zapobiega jednak nowym zakażeniom w okresie przedporodowym. Przyspieszenie inwolucji wymienia i stymulacja układu odpornościowego w pierwszych dniach po zaprzestaniu doju może prowadzić do zmniejszenia liczby nowych zakażeń.

Piśmiennictwo

- Bradley A., Green M.: A study of the incidence and significance of intramammary enterobacterial infections acquired during the dry period. *J. Dairy Sci.* 2000, **83**, 1957–1965.
- Smith K. L., Todhunter D. A., Schoenberger P. S.: Environmental pathogens and intra-mammary infection during the dry period. *J. Dairy Sci.* 1985, **68**, 402–417.
- Sordillo L., Aitken S.: Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009, **128**, 104–109.
- Atabai K., Sheppard D., Werb Z.: Roles of the innate immune system in mammary gland remodeling during involution. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 2007, **12**, 37–45.
- Leitner G., Anug M., Meri U., Silanikove N.: Involution stage II of the bovine mammary obstructs pregnancy general biological implications: gland. *Israel J. Vet. Med.* 2007, **62**, 3–4.
- Pai V.P., Horseman N.D.: *Mammary Gland Involution: Events, Regulation and Influences on Breast Disease. Endothelium and Epithelium*. Editors: J. Carrasco and M. Mota, pp. 247–284, 2011 Nova Science Publishers, Inc.
- Pai V.P., Horseman N.D.: Multiple Cellular Responses to Serotonin Contribute to Epithelial Homeostasis. *PLoS One* 2011, **6**, e17028, doi: 10.1371.
- Capuco A., Akers R.: Mammary involution in dairy animals. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 1999, **4**, 137–144.
- Rainard P., Riollet C.: Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.* 2005, **37**, 369–400.
- Stelwagen K., Singh K.: The role of tight junctions in mammary gland function. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 2014, **19**, 131–138.

- Shamay, A., Shapiro, E., Leitner, G. and Silanikove, N.: Infusions of casein hydrolyzates into the mammary gland disrupt tight junction integrity and induce involution in cows. *J. Dairy Sci.* 2003, **86**, 1250–1258.
- Chou W.K., Yu T.C., Chen S.E., Peh H.C., Liu W.B., Chen M.T., Nagahata H., Chang C.J.: TNF-α-mediated-plasminogen activation on neutrophils is involved in the high plasmin activity in mammary secretion of drying-off cows. *J. Dairy Res.* 2009, **76**, 459–468.
- Yu T.C., Chang C.J., Ho C.H., Peh H.C., Chen S.E., Liu W.B., Peng H.Y., Piamya P., Chen M.T., Nagahata H.: Modifications of the defense and remodeling functionalities of bovine neutrophils inside the mammary gland of milk stasis cows received a commercial dry-cow treatment. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2011, **144**, 210–219.
- Dingwell R.T., Leslie K.E., Schukken Y.H., Sargeant J.M., Timms L.L., Duffell T.F., Keefe G.P., Kelton D.F., Lissemore K.D., Conklin J.: Association of cow and quarter-level factors at drying-off with new intramammary infections during the dry period. *Prev. Vet. Med.* 2004, **63**, 75–89.
- Bitman J., Wood D., Bright S., Miller R.: Lipid composition of bovine teat canal keratin. *J. Dairy Sci.* 1988, **71**, 1389–1395.
- Bright S., Bitman J., Capuco A., Wood D., Miller R.: Methods of collection and lipid composition of teat canal keratin in dry and lactating cows. *J. Dairy Sci.* 1990, **73**, 98–106.
- Treese J., Morese G., Lley C.: Lipid analyses of bovine teat canal keratin. *J. Dairy Sci.* 1966, **49**, 1240–1244.
- Newman K., Rajala-Schultz P., Lakritz J., De Graves F.: Lactoferrin concentrations in bovine milk prior to dry-off. *J. Dairy Res.* 2009, **76**, 426–432.
- Ollivier-Bousquet M.: Transferrin and prolactin transcytosis in the lactating mammary epithelial cell. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 1998, **3**, 303–313.
- Legrand D., Ellass E., Carpentier M., Mazurier J.: Interactions of lactoferrin with cells involved in immune function. *Biochem. Cell Biol.* 2006, **84**, 282–290.
- Linzel J., Mephram T., Peaker M.: The secretion of citrate into milk. *J. Physiol.* 1976, **260**, 739–750.
- Targowski S., Niemiałowski M.: Inhibition of lacteal leukocyte phagocytosis by colostrum, nonlactating secretion, and mastitic milk. *Am. J. Vet. Res.* 1986, **47**, 1940–1945.
- Rojas R., Apodaca G.: Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002, **3**, 944–955.
- Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A.: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004, **303**, 1532–1535.
- Lippolis J.D., Reinhardt T.A., Goff J.P., Horst R.L.: Neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils is not inhibited by milk. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2006, **113**, 248–255.
- Oviedo-Boyo, J., Valdez-Alarcon, J.J., Caero-Juarez, M., Ochoa-Zarzosa, A., Lopez-Meza, J. E., Bravo-Patino, A., Baizabal-Aguirre, V.M.: Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J. Infection* 2007, **54**, 399–409.
- Legrand D., Pierce A., Ellass E., Carpentier M., Mariller C., Mazurier J.: Lactoferrin structure and functions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008, **606**, 163–194.
- Molenaar A., Kuys Y., Davis S., Wilkins R., Mead P., Tweedie J., Elevation of lactoferrin gene expression in developing, ductal, resting, and regressing parenchymal epithelium of the ruminant mammary gland. *J. Dairy Sci.* 1996, **79**, 1198–1208.
- Sordillo L., Streicher K.: Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 2002, **7**, 135–146.
- Hancock J., Salisbury V., Ovejero-Boglione M., Cherry R., Hoare C., Eisenthal R., Harrison R.: Antimicrobial properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002, **46**, 3308–3310.
- Silanikove N., Shapiro E., Shamay A., Leitner G.: Role of xanthine oxidase, lactoperoxidase, and NO in the innate immune system of mammary secretion during active involution in dairy cows: manipulation with casein hydrolyzates. *Free Radic. Biol. Med.* 2005, **38**, 1139–1151.
- Nagahata H., Saito S., Noda H.: Changes in N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase and β-Glucuronidase activities in milk during bovine mastitis. *Can. J. Vet. Res.* 1987, **51**, 126–134.
- Hammon D., Evjen I., Dhiman T., Goff, J., Walters, J.: Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2006, **113**, 21–29.

Dr hab. Hanna Markiewicz, e-mail: hannahmar@op.pl