

THE DYNAMICS OF MORPHOLOGICAL CHANGES DURING *IN VITRO* AGING OF BOVINE VIRGIN MAMMARY GLAND NEUTROPHILS

DYNAMIKA MORFOLOGICKÝCH ZMĚN MAMMÁRNÍCH NEUTROFILNÍCH LEUKOCYTŮ V PRŮBĚHU JEJICH STÁRNUTÍ *IN VITRO*

Pospíšilová D., Sládek Z.

Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: xvasick0@node.mendelu.cz, sladek@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The presented study deals with an *in vitro* analysis of the dynamics of bovine mammary gland neutrophil apoptosis based on the detection of morphological changes. The neutrophils were isolated from mammary glands of five virgin heifers. The mammary glands were lavaged, the suspensions were then bacteriologically examined, and total and differential cell counts were made. The cells were cultivated *in vitro* for 4 hours. After 2, 3 and 4 hours of cultivation, they were panoptically stained, and the proportions of apoptotic neutrophils and trypan blue positive neutrophils were determined. During the cultivation, a progressive increase in number of apoptotic neutrophils in various stages of apoptosis – karyopyknosis, zeiosis and apoptotic bodies – was observed. Karyopyknotic neutrophils represented a dominant part of the apoptotic neutrophil population in the course of the whole cultivation. The results of this work show that spontaneous apoptosis and secondary neutrophil necrosis must be taken into account during *in vitro* cultivations of bovine mammary gland neutrophils.

Key words: neutrophil, apoptosis, aging, bovine virgin mammary gland

ABSTRAKT

Předmětem práce se stala analýza dynamiky apoptózy neutrofilů mléčné žlázy skotu *in vitro* založená na detekci morfologických změn. Studie byla provedena na juvenilních mléčných žlázách 5 nebřezích jalovic. Buňky byly odebrány laváží, která byla podrobena bakteriologickému vyšetření a stanovení celkového a diferenciálního počtu buněk. Buňky byly kultivovány *in vitro* po dobu 4 hodin. Během kultivace byly v časových intervalech po 2, 3 a 4 hodinách panopticky obarveny a bylo stanoveno zastoupení apoptotických neutrofilů a neutrofilů pozitivních na trypan blue. Během kultivace došlo k progresivnímu nárůstu podílu apoptotických neutrofilů reprezentovaných jednotlivými stádii apoptózy (karyopyknosis, zeiosis a apoptotic bodies). Po celou dobu kultivace tvořily karyopyknotické neutrofilie dominantní část populace apoptotických neutrofilů. Výsledky práce dokládají, že při *in vitro* kultivacích neutrofilů mléčné žlázy skotu je nutné počítat s výskytem spontánní apoptózy a sekundární nekrózy těchto buněk.

Klíčová slova: neutrofil, apoptóza, stárnutí, mléčná žláza skotu

ÚVOD

Polymorfonukleární leukocyty (neutrofilý), představují buňky, které z první linie zprostředkovávají buněčnou ochranu mléčné žlázy (Sordillo et al., 1997). Vznikají v kostní dřeni a jsou vyplavovány do periferní krve, kde pronikají skrze stěnu kapilár a migrují do dutinového systému mléčné žlázy. Zde uplatňují svoji funkci, kterou je fagocytóza bakterií (Paape et al., 1991).

Neutrofilý představují postmitotické, terminálně diferencované elementy, které mají omezenou životnost 1 až 2 dny (Paape and Wergin, 1977). Vlivem chemotaktických látek migrují do místa produkce těchto látek, např. do infikovaného dutinového systému mléčné žlázy (Sládek and Ryšánek, 1998).

Apoptóza neutrofilů je přísně regulovaný proces, který je u většiny buněk charakterizován serií specifických strukturálních změn. Mezi tyto změny patří sraštění buněk, zpěnění cytoplazmatické membrány, kondenzace cytoplazmy a chromatinu jádra a nakonec fragmentace buněk do apoptotických tělísek (Squier et al., 1995).

Samotná přítomnost apoptotických neutrofilů v dutinovém systému mléčné žlázy může představovat významný aspekt, který je nutno vzít v úvahu při použití neutrofilů k následným *in vitro* studiím. Vzhledem k tomu, že influx neutrofilů do dutinového systému mléčné žlázy probíhá kontinuálně, je tkáňový pool neutrofilů tvořen směsí různě starých buněk. Některé z nich již vstoupily a nebo následně vstoupí do procesu senescence, finalizovaném apoptózou (Sládek and Ryšánek, 2000a,b).

Apoptóza neutrofilů je charakterizována nejen specifickými morfologickými a biochemickými vlastnostmi, ale provází ji rovněž ztráta celé řady fundamentálních funkcí. Mezi nejdůležitější z nich patří snížení schopnosti neutrofilů rychle měnit tvar, snížení schopnosti náhodné migrace a chemotaxe, snížení schopnosti reakce na stimulaci, snížení intenzity fagocytózy, popřípadě totální neschopnost fagocytovat, dále snížení stupně degranulace a respiračního vzplanutí (Haslett et al., 1991; Whyte et al., 1993; Squier et al., 1995; Narayanan et al., 1997; Tanji-Matsuba et al., 1998; Van Oostveldt et al., 2002).

Kultivace neutrofilů *in vitro* tedy bude provázena výskytem částečně či plně nefunkčních buněk s charakteristickými morfologickými alteracemi, představujícími různá stádia apoptózy (Payne et al., 1994). V této souvislosti bude jistě hrát důležitou roli délka kultivace, neboť bylo prokázáno, že mezi délkou kultivace neutrofilů a expresí apoptózy existuje přímá úměra (Payne et al., 1994).

Obvykle, se při studiu funkčních aspektů neutrofilů mléčné žlázy skotu *in vitro*, používají krátkodobé kultivace v délce do jedné hodiny (Smith and Romel 1977; Ryšánek et al., 2001). Existují však techniky, použité např. při studiu interakce neutrofilů s prokaryonty nebo s antibiotiky, které vyžadují delší dobu kultivace v rozsahu 2 až 8, ale i 24 hodin (Sanchez et al., 1988; Czuprinski et al., 1996; Yang et al., 1998; Van Oostveldt et al., 1999).

V současné době neexistují informace o senescenci neutrofilů mléčné žlázy skotu během kultivace těchto buněk in vitro. Proto si nelze vytvořit reálnou představu o dynamice procesu apoptózy a tím jejího potenciálního vlivu na podíl nefunkčních buněk v populaci kultivovaných neutrofilů.

Proto se předmětem této práce stala analýza dynamiky apoptózy neutrofilů mléčné žlázy skotu in vitro, založená na detekci morfologických změn těchto buněk.

MATERIÁL A METODIKA

Experimentální zvířata

Pokus byl realizován na 5 klinicky zdravých jalovicích, kříženkách holštýnského a českého strakatého plemene ve věku 14 až 16 měsíců. Všechny jalovice byly bez přítomnosti intramamární infekce. Všechny mléčné žlázy byly vyšetřeny se zaměřením na posouzení celkové morfologie vemene a průchodnost jednotlivých strukových kanálků, bylo provedeno i bakteriologické vyšetření laváží mléčných žláz.

Izolace neutrofilů

Neutrofilů z mléčné žlázy byly izolovány pomocí metody (Sládek and Ryšánek, 2000a) za použití modelu indukovaného influxu. Mléčné žlázy byly důkladně desinfikovány etylalkoholem a následně podrobeny laváži. Laváž byla provedena pomocí upravených uretrálních katetrů (AC5306CH06, Porges S.A., France) sterilním pufrovaným fyziologickým roztokem (PBS) o objemu 20 ml. Po 24 hodinách byly mléčné žlázy vypláchnuty 20ml PBS. Tímto krokem byly získány laváže mléčné žlázy, které obsahovaly vysoce koncentrovanou buněčnou populaci neutrofilů.

Bakteriologické vyšetření bylo provedeno kultivací na agar s 5% propraných beraních erytrocytů a aerobní kultivací při 37°C po dobu 24 hodin. Všechny vyšetřené mléčné žlázy byly bakteriologicky negativní, neboť na krevním agaru nevyrostly žádné kolonie bakterií.

Kultivace mammárních neutrofilů

Izolované mammární neutrofilů byly adjustovány (5×10^6 /ml) a resuspendovány v kultivační směsi [složení: médium RPMI 1640 a 10% fetální bovinní sérum (Sigma Chemical CO, Praha, Česká republika)]. Pro světelnou mikroskopii byly adjustované suspenze nanášeny na podložní skla (0,5 ml/sklo), přičemž každý vyšetřovaný vzorek buněčné suspenze byl nanášen v duplikátech. Skla byla následně inkubována při 37°C v 5% CO₂ saturované atmosféře po dobu 4 hodin metodou dle Savill et al. (1989).

Světelná mikroskopie a stárnutí neutrofilů

Životaschopnost kultivovaných neutrofilů byla hodnocena testem vylučování trypanové modři na nejméně 200 neutrofilech. A dále byly hodnoceny dynamické změny při stárnutí neutrofilů, počítáním 200 apoptotických buněk z každého skla. Rovněž byla rozlišována tři základní, strukturálně odlišná stádia apoptózy: karyopyknosis, zeiosis a apoptotická tělíska, metodou dle Sládek and Ryšánek (2000a).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Identifikace tří populací neutrofilů

Analýza ve světelném mikroskopu, při použití panoptického barvení, určila tři odlišné populace neutrofilů: normální neutrofilie, apoptotické a nekrotické. Tříděním těchto populací a vyhodnocením ve světelném mikroskopu byly odhaleny zřetelné morfologické odlišnosti.

Normální neutrofilie mají typickou morfologickou stavbu zralých neutrofilů. Tato populace je zastoupena buňkami o velikosti (7 až 10 μm) se segmentovanými buněčnými jádry, obsahující granula heterochromatinu, růžová cytoplazma má viditelná cytoplazmatická granula a pseudopodia.

Apoptotické neutrofilie zahrnují tři morfologicky rozlišitelná stádia: karyopyknosis, zeiosis a apoptotická tělíska. Karyopyknosis neutrofilie jsou charakteristické přítomností vakuol. Neutrofilie se zpěněnou cytoplazmatickou membránou jsou typické pro stadium zeózy. A konečně apoptotická tělíska jsou charakterizována velikostí do 3 μm .

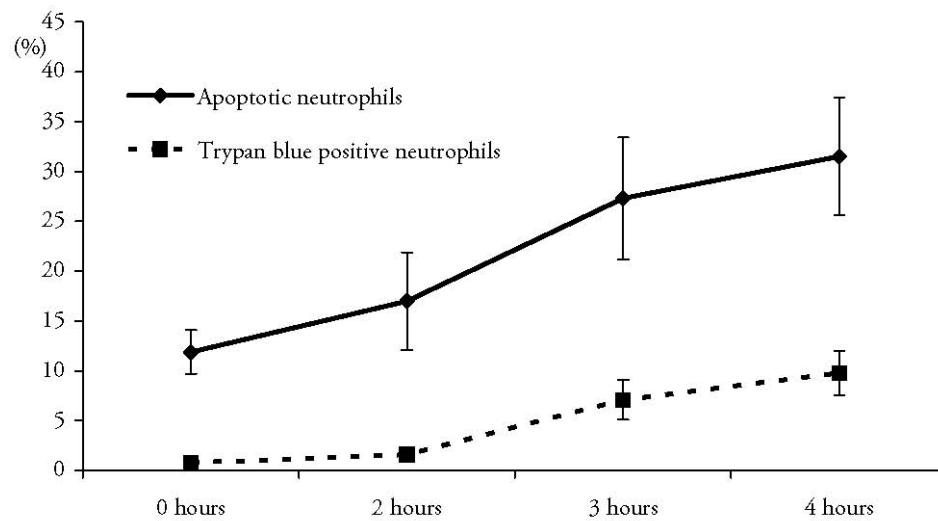
nekrotické neutrofilie byly trypan blue pozitivní buňky, u kterých je charakteristickým znakem prasklá plazmatická a jaderná membrána. Nekrotické neutrofilie jsou zastoupeny primární nekrotizací v čerstvé suspenzi a sekundární nekrotizací u buněk po 4 hodinách kultivace.

Dynamika stárnutí neutrofilů

V čerstvé „fresh“ suspenzi bylo detekováno 11,9 % apoptotických a 0,8 % nekrotických neutrofilů. Apoptotické buňky v suspenzi čerstvě izolovaných neutrofilů tvořilo 9,3 % karyopyknosis buněk, 1,7 % buněk ve stádiu zeiosis a 0,9 % apoptotických tělísek.

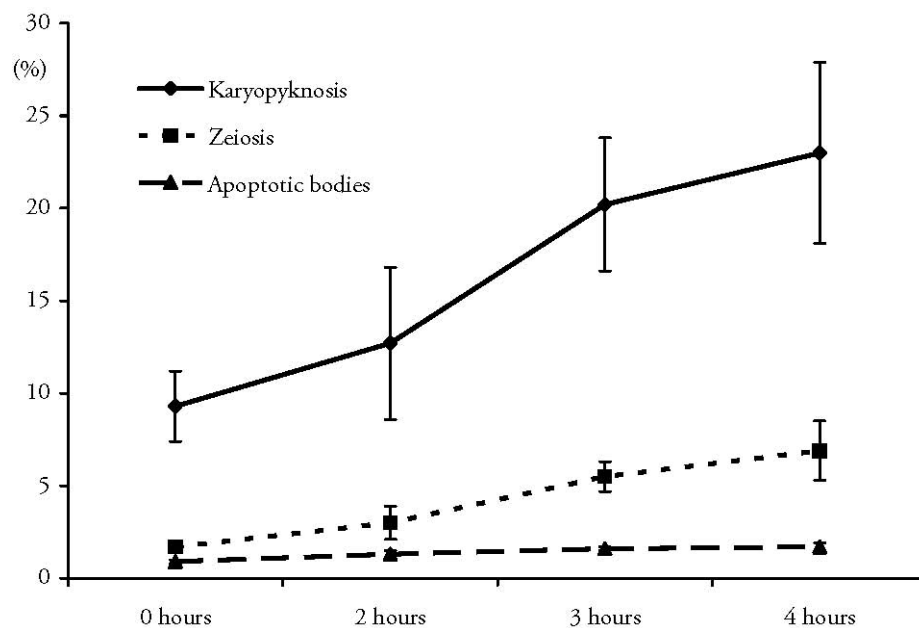
Během kultivace došlo k výrazným změnám v zastoupení apoptotických neutrofilů a neutrofilů s porušenou integritou cytoplazmatické membrány. Již po 2 hodinách se zvýšil podíl apoptotických neutrofilů o 5,1 %, po 3 hodinách o 15,4 % a po 4 hodinách o necelých 20 %. Vedle apoptózy došlo během kultivace k výraznému desetinásobnému zvýšení podílu neutrofilů s porušenou integritou cytoplazmatické membrány. Po 4 hodinách bylo oproti vstupní suspenzi (0,9 %) zaznamenáno celkem 9,8 % trypan blue pozitivních buněk, zastoupení apoptotických a trypan blue pozitivních buněk zachycuje graf č.1.

Graf 1 Apoptotické a trypan blue pozitivní neutrofilů



Dynamiku apoptózy neutrofilů během kultivace in vitro vyjádřenou zastoupením jednotlivých stádií apoptózy znázorňuje graf č. 2.

Graf 2 Dynamika apoptózy



Po 2 hodinách kultivace došlo k nárůstu podílů všech tří stádií apoptózy neutrofilů, přičemž nejvyšší poměrný nárůst byl zaznamenán u stádia zeiosis, kde se jeho podíl zvýšil téměř dvojnásobně. Stejný trend nárůstu pokračoval do konce kultivace zejména u stádia karyopyknózy a zeiózy, kde po 4 hodinách bylo zaznamenáno 22,9 % karyopyknotických buněk a 6,9 % buněk ve stádiu zeiózis. Naproti tomu byl během 4 hodinové kultivace

zaznamenán nízký nárůst apoptotických tělísek, kterých bylo po 4 hodinách kultivace pouze 1,7 %.

Tvorba a zánik neutrofilů jsou úzce regulované procesy, které udržují konstantní počet těchto buněk v krvi a v tělních tkáních. Do mléčné žlázy skotu se neutrofilové dostávají migrací z krve a vzhledem k jejich krátké životnosti zde podstupují apoptózu (Sládek and Ryšánek, 2000a). Z toho důvodu byly v této práci při použití indukovaného influxu buněk s intramamární aplikací PBS a již dříve s muramyl-dipeptidem (Sládek and Ryšánek, 2000b) a lipopolysacharidem (Sládek and Ryšánek, 2001a) zaznamenány apoptotické neutrofilové. Jejich podíl činil kolem 10 % neutrofilů, což je v porovnání s laktující mléčnou žlázou dojníc o mnoho méně. Van Oostveldt et al. (2001) totiž zaznamenali více než 40 % apoptotických neutrofilů v mléce během časně laktace. Tato diference je však pochopitelná, neboť funkčně představuje laktující mléčná žláza dojníc oproti mléčné žláze nebřezích jalovic odlišně exploatovaný orgán s jiným biochemismem a přítomností korpuskulárních komponent mléka, které výrazně ovlivňují funkci a životnost neutrofilů (Paape et al., 1977).

Ačkoliv se životnost neutrofilů pohybuje v rozmezí 1 až 2 dnů, lze apoptotické neutrofilové zaznamenat již během 4 hodin po indukci influxu buněk. Jejich přítomnost je výsledkem dvou procesů a lze ji vysvětlit následovně. Zaprvé, intramamární aplikací PBS či prozánětlivého činitele dojde k indukci zánětlivé odpovědi, která je charakterizovaná masivním influxem neutrofilů do dutinového systému mléčné žlázy a jejich akumulací. Neutrofilové jsou k migraci rekrutováni v různém stádiu (Cox et al., 1995) a navíc probíhá influx kontinuálně. Proto populace neutrofilů představuje směs různě starých buněk. Za druhé, dochází k iniciaci rezoluce zánětlivé odpovědi, která je charakterizovaná fyzickým odstraněním neutrofilů apoptózou a následnou fagocytózou makrofágy (Sládek and Ryšánek, 2000b). Uvedené skutečnosti představují významný aspekt, který je nutno brát v úvahu při použití takto získané populace neutrofilů k následným in vitro studiím.

Apoptóza buněk je charakteristická typickými morfologickými vlastnostmi, mezi které patří zejména sraštění buněk, kondenzace chromatinu (karyopyknosis), blebbing (zeiosis) a fragmentace do apoptotických tělísek (Kerr et al., 1972). V této studii se tyto morfologické znaky staly kritériem pro analýzu dynamiky apoptózy neutrofilů mléčné žlázy skotu během jejich kultivace in vitro. Přitom bylo zjištěno, že při kultivaci tyto buňky podstupují apoptózu, přičemž s prodlužující se dobou kultivace se úměrně zvyšuje počet apoptotických buněk a rovněž počet buněk s porušenou integritou cytoplazmatické membrány.

Při podrobné morfologické analýze bylo zjištěno, že strukturální vlastnosti apoptotických neutrofilů jsou téměř shodné jak v podmínkách in vivo, tak během kultivace in vitro. U apoptotických neutrofilů bylo možno zaznamenat všechna tři stadia apoptózy, tedy stádium karyopyknosis, stádium zeiosis a stádium apoptotických tělísek. U apoptotických neutrofilů in vitro byly zejména během stadia karyopyknózy patrné intracytoplazmatické vakuoly. Tyto ve světelném mikroskopu méně světlolomně intenzivní šedobílé okrsky nebyly pozorovány u apoptotických neutrofilů in vivo (Sládek and Ryšánek, 2000a). Na existenci těchto vakuol upozornili jako první Payne et al. (1994) u krevních humánních neutrofilů kultivovaných in vitro. Podle nich spočívá geneze vakuol v přímém splynutí oddělených

vesikulí pocházejících z částí endoplazmatického retikula, neboť mezi četností výskytu vakuol a četností výskytu dilatovaných cisteren endoplazmatického retikula byl pozorován inverzní vztah. Vakuoly nebyly pozorovány u apoptotických neutrofilů *in vivo*, ale pouze *in vitro*. Neznamená to však, že u apoptotických neutrofilů *in vivo* vakuoly nevznikají, neboť rychlá fagocytóza apoptotických buněk makrofágy může vytvoření vakuol předejít (Payne et al., 1994).

Dynamika apoptózy během kultivace byla v této práci stanovena analýzou jednotlivých morfologicky odlišných stádií apoptózy. Během kultivace bylo možno zaznamenat dominantní podíl karyopyknotických buněk, stejně tak jako v populaci čerstvě izolovaných apoptotických neutrofilů. Karyopyknóza představuje časné, první stádium apoptózy, které je charakterizováno sraštěním buněk, kondenzací chromatinu a splynutím jaderných segmentů. Během tohoto stádia apoptózy dochází rovněž k translokaci fosfatidylserinu (Fadok et al., 1992), což u neutrofilů mléčné žlázy skotu již bylo zaznamenáno (Sládek et al., 2001; Van Oostveldt et al., 2001). Během 4 hodinové kultivace došlo k více než dvojnásobnému zvýšení podílu karyopyknotických neutrofilů. Z nichž přibližně čtvrtina přešla do stádia zeiosis. Podíl apoptotických neutrofilů v zeiosis u čerstvě izolovaných buněk činil pouze necelá dvě procenta. Během kultivace došlo ke čtyřnásobnému zvýšení podílu zeiotických buněk. Apoptotická tělíska tvořila během kultivace velmi nízký, téměř konstantní, podíl apoptotických neutrofilů. Nicméně výskyt apoptotických neutrofilů v zeiosis a apoptotických tělísek již v čerstvě izolované suspenzi buněk dokazuje kontinuální apoptotický proces započatý před izolací a následnou kultivací, tedy již v dutinovém systému mléčné žlázy. Uvedené údaje svědčí o rychlosti realizace morfologických změn během procesu apoptózy.

ZÁVĚR

V literatuře neexistují data o dynamice apoptózy neutrofilů mléčné žlázy skotu *in vitro*, ale pouze krevních neutrofilů skotu. U bovinních krevních neutrofilů podstupuje apoptózu *in vitro* po 2 hodinách kultivace cca 3-5 % buněk a po 4 hodinách až 15 % buněk. Srovnáme-li uvedené údaje s našimi výsledky, je možno konstatovat, že je dynamika obou populací neutrofilů (krevních a mammárních) *in vitro* téměř shodná. To je jistě překvapivé zjištění, neboť hypoteticky lze očekávat vyšší výskyt apoptotických buněk u neutrofilů tkáňového poolu, než u krevních neutrofilů. Důvodem je pokročilé stáří mammárních neutrofilů, jejich nižší energetické zásoby a v neposlední řadě rovněž proapoptotický efekt migrace (Van Oostveldt et al., 2002).

Na druhé straně je však nutno zdůraznit, že v dutinovém systému mléčné žlázy skotu existuje rozsáhlá síť biologických vlivů, která nebyla doposud exaktně objasněna. Mezi tyto vlivy, které mohou významně ovlivňovat nejen samotnou životnost, ale rovněž funkci neutrofilů, patří například odlišný biochemismus a vzájemné interakce buněk, především mezi neutrofily a makrofágy. Neméně významný vliv na životnost (apoptózu) neutrofilů mohou mít

cytokiny, zvláště prozánětlivé (například interleukin-1, TNF- α), uvolňované především v iniciální fázi zánětlivé odpovědi mléčné žlázy (Rainard a Paape, 1997).

Během kultivace neutrofilů korespondoval se zvýšením podílu apoptotických buněk nárůst buněk s porušenou integritou cytoplazmatické membrány. Z necelého jednoho procenta vzrostl po 4 hodinách kultivace na deset procent. Neutrofilové pozitivní na trypanovou modř představují sekundárně nekrotické apoptotické buňky. Neboť v podmínkách *in vitro* nedochází k fagocytóze apoptotických buněk makrofágy, jak je tomu v podmínkách *in vivo*. Apoptotické buňky po vyčerpání energetických zásob ztrácejí schopnost udržet integritu membrán, načež následně podléhají nekróze. Morfologicky jsou apoptotické neutrofilové podléhající sekundární nekróze charakterizovány totální destrukcí jaderných a cytoplazmatických komponent se všemi projevy a znaky nekrózy. Důsledky sekundární nekrózy apoptotických neutrofilů se svým potencionálně negativním účinkem na okolí (v podmínkách *in vitro* kultivační médium) blíží účinku uvolněného histotoxického obsahu granulí při nekróze neutrofilů (Payne et al., 1994).

Uvedená zjištění o počtu apoptotických buněk a buněk pozitivních na trypanovou modř během kultivace neznamenaají pouze prosté kvantitativní vyjádření intenzity procesu stárnutí neutrofilů mléčné žlázy skotu *in vitro*. Ale představují prvotní údaje, které mohou hrát důležitou roli v interpretaci výsledků funkčních analýz těchto buněk, zvláště s použitím delší doby kultivace. Při ní lze očekávat výskyt funkční heterogenity, neboť každá kultivace se do jisté míry stává zároveň modelem stárnutí buněk.

LITERATURA

- Cox G., Crossley J., Xing Z. (1995): Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation *in vivo*. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.*, 12, 232–237.
- Haslett G., Lee A., Savill J.S., Meagher L., Whyte M.K. (1991): Apoptosis (programmed cell death) and functional changes in aging neutrophils: modulation by inflammatory mediators. *Chest*, 99, 6S.
- Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Brit. J. Cancer*, 68, 239–257.
- Narayanan P.K., Ragheb K., Lawler G., Robinson J.P. (1997): Defects in intracellular oxidative metabolism of neutrophils undergoing apoptosis. *J. Leukocyte Biol.*, 61, 481–488.
- Paape M.J., Wergin W.P. (1977): The leukocyte as a defense mechanism. *JAVMA*, 170, 1214–1223.
- Paape M.J., Guindry A.J., Jain N.C., Miller R.H. (1991): Leukocytic defense mechanism in the udder. *Fleming Vet. J.*, 62, 95–109.

- Payne C.L., Glasser L., Tischler M.E., Wyckoff D., Cromey D., Fiederlein R., Bohnert O. (1994): Programmed cell death of the normal human neutrophil: An *in vitro* model of senescence. *Microsc. Res. Tech.*, *28*, 327–344.
- Raff M.C. (1992): Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, *356*, 397–400.
- Rainard P., Paape M.J. (1997): Sensitization of the bovine mammary gland to *Escherichia coli* endotoxin. *Vet. Res.*, *28*, 231–238.
- Ryšánek D., Babák V., Sládek Z., Toman M. (2001): Variation among unbred heifers in the activities of their mammary gland and blood polymorphonuclear leucocytes. *J. Vet. Med. B*, *48*, 31–42.
- Sanchez M.S., Ford C.W., Yancey R.J. (1988): Evaluation of antibiotic effectiveness against *Staphylococcus aureus* surviving within the bovine mammary gland macrophage. *J. Antimicrob. Chemother.*, *21*, 773–786.
- Savill J.S., Willie A.H., Henson J.E., Walport M.J., Henson P.M., Haslett C. (1989): Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest.*, *83*, 865–867.
- Sládek Z., Ryšánek D. (2000a): Morphology of apoptosis of polymorphonuclear leukocytes isolated from juvenile bovine mammary glands. *Vet. Med. – Czech*, *45*, 71–81.
- Sládek Z., Ryšánek D. (2000b): Apoptosis of polymorphonuclear leukocytes of the juvenile bovine mammary gland during induced influx. *Vet. Res.*, *3*, 553–563.
- Sládek Z., Ryšánek D. (2001): Neutrophil apoptosis during the resolution of bovine mammary gland injury. *Res. Vet. Sci.*, *70*, 41–46.
- Sládek Z., Ryšánek D., Faldyna M. (2001): Light microscopic and flow cytometric detection apoptosis and necrosis of neutrophils from bovine virgin mammary gland during induced influx. *Acta Vet. Brno*, *70*, 64–69.
- Smith D.L., Rommel F. (1977): A rapid micro method for the simultaneous determination of phagocytic-microbiocidal activity of human peripheral blood leukocytes *in vitro*. *J. Immunol. Methods*, *17*, 241–247.
- Sordillo L.M., Shefer-Weaver K., Derosa D. (1997): Immunobiology of the mammary gland. *J. Dairy Sci.*, *80*, 1851–1865.
- Squier M.T., Sehnert A.J., Cohen J.J. (1995): Apoptosis in leukocytes. *J. Leukocyte Biol.*, *57*, 2–10.
- Stevens P.K., Czuprynski C.J. (1996): *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induces bovine leukocytes to undergo morphologic changes consistent with apoptosis *in vitro*. *Infect. Immun.*, *64*, 2687–2694.
- Tanji-Matsuba K., Van Eeden S.F., Saito Y., Okazawa M., Klut M.F., Hayashi S., Hogg J.C. (1998): Functional changes in aging polymorphonuclear leukocytes. *Circulation*, *97*, 91–98.

- Van Oostveldt K., Dosogne H., Burvenich C., Paape M.J., Brochez V., Van den Eeckhout E. (1999): Flow cytometric procedure to detect apoptosis of bovine polymorphonuclear leukocytes in blood. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, *70*, 125–133.
- Van Oostveldt K., Van Groenweghe F., Dosogne H., Burvenich C. (2001): Apoptosis and necrosis of blood and milk polymorphonuclear leukocytes in early and midlactating healthy cows. *Vet. Res.*, *32*, 617–622.
- Van Oostveldt K., Paape M.J., Burvenich C. (2002a): Apoptosis of bovine neutrophils following diapedesis through a monolayer of endothelial and mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.*, *85*, 139–147.
- Van Oostveldt K., Paape M.J., Dosogne H., Burvenich C. (2002b): Effect of apoptosis on phagocytosis, respiratory burst and CD18 adhesion receptor expression of bovine neutrophils. *Domest. Anim. Endocrin.*, *22*, 37–50.
- Whyte M.K.B., Meagher L.C., MacDermot J., Haslett C. (1993): Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J. Immunol.*, *150*, 5124–5134.
- Yang Y.F., Sylte M.J., Czuprynski C.J. (1998): Apoptosis: a possible tactic of *Haemophilus somnus* for evasion