



**Programovaná buněčná smrt makrofágů  
v mléčné žláze u skotu**

*Vedoucí práce:*  
prof. MVDr. Zbyšek Sládek, Ph.D.

*Vypracovala:*  
Iva Skřípská

## ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Programovaná buněčná smrt makrofágů v mléčné žláze u skotu vypracovala samostatně a použila jsem pramenů, které cituji a uvádím v příloženém seznamu literatury.

Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně, dne .....

Podpis .....

## **PODĚKOVÁNÍ**

Děkuji panu profesoru MVDr. Zbyšku Sládkovi, Ph.D. za jeho vedení, rady, připomínky a trpělivost při vedení mé bakalářské práce a své rodině za její podporu při mém studiu.

## **ABSTRAKT**

Bakalářská práce podává všeobecný přehled anatomie a fyziologie mléčné žlázy skotu a jejích obranných mechanismů se zaměřením na makrofágy, jejich charakter, aktivaci a funkce. Druhá část popisuje apoptózu makrofágů na konci jejich životního cyklu, jejich přeměnu z monocytů a působení na jejich okolí ve tkáni mléčné žlázy. Práce také podává přehled metod detekce apoptických makrofágů a popisuje výhody a nevýhody jednotlivých metod.

Klíčová slova: mléčná žláza, makrofág, apoptóza, nekróza, dojnice

## **ABSTRACT**

This bachelor's thesis provides a general overview of the anatomy and physiology of bovine mammary gland and its defence mechanisms with the focus on macrophages, their characteristic features, activation and functions. The second part describes apoptosis of macrophages at the end of their life cycle, their transformation from monocytes and their influence on the surrounding mammary gland tissue. The thesis also summarises methods of detection of apoptotic macrophages and depicts the advantages and disadvantages of each method.

Key words: mammary gland, macrophages, apoptosis, necrosis, milking cow

## OBSAH

1	ÚVOD.....	6
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	7
2.1	Mléčná žláza .....	7
2.1.1	Anatomie mléčné žlázy.....	7
2.1.2	Fyziologické procesy mléčné žlázy .....	10
2.2	Obranné mechanismy .....	11
2.2.1	Mechanická obrana .....	12
2.2.2	Buňky imunitního systému .....	12
2.3	Makrofágy mléčné žlázy .....	15
2.3.1	Obecná charakteristika makrofágů .....	15
2.3.2	Struktura makrofágů .....	16
2.3.3	Původ makrofágů.....	19
2.3.4	Funkce makrofágů .....	20
2.3.5	Osud makrofágů.....	23
2.4	Metody detekce apoptózy u makrofágů .....	29
2.4.1	Mikroskopické metody .....	30
2.4.2	Biochemické metody .....	31
2.4.3	Genetické metody detekce .....	32
4	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY .....	34
5	SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....	43

# 1 ÚVOD

Mléčná žláza je vybavena obrannými mechanismy, které kompenzují sníženou obranyschopnost v důsledku šlechtění na vyšší mléčnost. Zvýšená produkce mléka je požadována především kvůli zvýšené spotřebě konzumenty, i když mléko je primárně určeno jako výživa pro mláďata. I přesto je mléko poměrně běžná položka v lidské stravě, ať už jako mléko samotné nebo z něj vyráběné mléčné výrobky. Zvýšené nároky na produkci vedou ke snížené imunitě. To může usnadnit průnik patogenů a toxinů do organismu, což vede k častému výskytu mastitidních onemocnění.

Mastitidy představují závažný problém nejen z hlediska zdravotního stavu skotu. Mají i závažné ekonomické důsledky, neboť se jedná o jedno z nejdražších onemocnění z hlediska nákladů na veterinární péči. Rovněž dochází k výrazným ztrátám v produkci mléka, které v součtu mohou ovlivnit ekonomickou soběstačnost a rentabilitu chovu.

Obranné mechanismy mléčné žlázy pracují na základě podnětů specifického a nespecifického imunitního systému. Mezi buňky nespecifického imunitního systému patří lymfocyty, neutrofilní granulocyty a makrofágy. Makrofágy jsou známé především pro svou schopnost fagocytózy neboli pohlcování cizích těles vyskytujících se ve tkáních. Makrofágy v mléčné žláze fagocytují, kromě patogenů a jejich toxinů, i kaseinové micely a tukové globuly. Mimo fagocytózu jsou makrofágy důležité při regulaci zánětů mléčné žlázy, musí zasáhnout dříve, než zánět přejde do chronického průběhu a tím prodlouží onemocnění mléčné žlázy a vyřazení zvířete z produkce.

V práci se budu zabývat obrannými systémy se zaměřením na makrofágy a jejich úlohou v mléčné žláze u skotu. Budou popsány nejčastěji používané metody detekce apoptických makrofágů v mléčné žláze skotu. Největší důraz bude kladen na programovanou buněčnou smrt makrofágů, která má mimořádný význam u zánětlivých onemocnění skotu.

## **2 LITERÁRNÍ PŘEHLED**

Problematiku mléčné žlázy obecně upravují předpisy definující zdravotní stav produkčních zvířat a produktů, které následně zpracovávají pro humánní spotřebu. Tyto procesy upravuje zejména vyhláška ze dne 30. června 2003 o veterinárních požadavcích na mléko a mléčné výrobky, kterou stanovuje Ministerstvo zemědělství podle § 78 zákona č. 166/1999 Sb., o veterinární péči. Kromě této vyhlášky vydané Ministerstvem zemědělství, jsou v souvislosti s ošetřováním hovězího dobytka a zacházením s mlékem vydány i další směrnice, nařízení a předpisy. V těchto dílčích pokynech jsou specifikovány požadavky na syrové mléko, konzumní tepelně ošetřené mléko a mléko určené k výrobě mléčných výrobků, a dále podmínky jeho uvádění do oběhu, požadavky na kvalitu a senzorické vlastnosti mléčných výrobků určených k lidské spotřebě a podmínky jejich uvádění do oběhu.

Tato práce se zaměřuje na mléčnou žlázu skotu, zejména na to, jakou v ní mají funkci buňky nespecifické imunity, tzv. makrofágy, a jaký je jejich cyklus od jejich vzniku z monocytů až po emigraci do mléčné žlázy, jak zde působí a jakým způsobem je jejich životní cyklus zakončen.

### **2.1 Mléčná žláza**

Vemeno skotu se skládá ze dvou polovin a čtyř čtvrtí, každá z těchto čtvrtí má jednu vlastní mléčnou žlázu a dutinovou soustavu, ve které se vytváří mléko (Marvan et al., 1992). Rozdíl v množství vyprodukovaného mléka souvisí s typem plemene, zda je mléčné či masné, závisí na fázi laktace, velikosti zvířete a na jeho věku a zdravotním stavu. Plný rozvoj mléčné žlázy začíná u samic až během první březosti, u skotu je to zhruba během sedmého měsíce březosti.

#### **2.1.1 Anatomie mléčné žlázy**

Z anatomického hlediska se jedná o modifikovanou potní žlázu. Mléčná žláza je charakteristická pro samice savců, u kterých po porodu dochází k sekreci mleziva. Mlezivo se prvotně tvoří jako výživa pro sající mláďata (Marvan et al., 1992). Mléčná žláza vzniká ve ventrálním ektodermu v embryonální periodě a k jejímu rozvoji dochází v období pohlavní dospělosti (Miholová et al., 1976; Cowie et al., 1980). K největšímu

rozvoji mléčné žlázy dochází v období březosti, z důvodu působení luteinizačního hormonu a progesteronu (Miholová et al., 1976). U samců zůstává mléčná žláza nerozvinutá.

#### ***2.1.1.1 Žlázový parenchym a tuboalveoly***

Žlázový parenchym je složen z drobných lalůček - tubulů, které jsou plně rozvinuty v době laktace. Každý lalůček žláznatého parenchymu je tvořen několika primárními lalůčky. Primární lalůčky jsou propojeny vmezeřeným vazivem mezi sebou navzájem nitrolalůčkovými vývody, do kterých ústí mnoho sekrečních alveolů, ve kterých začíná tvorba sekretu - mléka (anonym, 2013).

Mléčné alveoly mají měchýřkovitý tvar a přecházejí do kratších sekrečních tubulů. Alveoly i tubuly jsou vystlány jednovrstevným sekrečním epitelem. Z vnější strany tuboalveolů se vyskytují košíčkové buňky, které mají schopnost smršťovat se (Marvan et al., 1992). Při aktivní kontrakci myoepiteliálních buněk, které obklopují alveoly, dochází k vytlačení mléka z alveolů do vývodných cest (Husvésth, 2011).

#### ***2.1.1.2 Vývodné cesty***

Mléko z tubulů a alveolů se odvádí tenkostěnnými vývody z primárních lalůček. Tyto vývody se spojují v silnější mezilalůčkové vývody, které se slévají do mlékovodů. Mlékovody se vzájemně propojují a společně vedou mléko do mlékojemů. Mlékojem neboli mléčná cisterna je dutina, kde se před vydojením či vysátím nahromadí 0,5 až 2,5 l mléka.

Ze žláznaté části mlékojemu mléko přechází do strukové části (Marvan et al., 1992). Přejít mezi strukovou a žláznatou částí mlékojemu je naznačen slizniční řasou, tzv. Fürstenberovou rozetou, otevírající se zvenku strukovým kanálkem, který je zakončený kruhovým svěračem z hladké svaloviny po celém obvodu strukového kanálku (Marvan et al., 1992; Köning et al., 2002).



### 2.1.1.3 Krvení a inervace vemene

Intenzivní prokrvení mléčné žlázy je důležité kvůli její správné funkci. Jedná se o mohutný orgán s plně rozvinutým oběhovým systémem. Hlavním tepenným kmenem je *arteria pudenda externa* (zevní stydká tepna), která vede okysličenou krev (Marvan et al., 1992). U dojných krav tato tepna může dosahovat tloušťky až 7-12 mm. *Arteria pudenda* (stydká tepna) se po výstupu z tříselného kanálu dále dělí na *arteria mammaria cranialis* a *arteria mammaria caudalis* (přední a zadní vemennou tepnu), které se postupně dělí až na tenkostěnné vlásečnice (Najbrt et al., 1982).

Odvod odkysličené krve má na starost převážně *vena pudenda externa* (zevní stydká žíla), do které se slévají povrchové i hluboké vv. *mammae* (žíly vemene). (Najbrt et al., 1982). Hluboké žíly uvnitř žláznatého těla doprovází tepny, povrchové žíly tento tepenný doprovod nemají. Druhou významnou odtokovou žílou je *vena epigastica caudalis superficialis* (mléčná žíla), která je široká a klikatí se přímo pod kůží. Mohutný vývin této žíly chovatelé hodnotí jako jeden ze znaků vysoké mléčné užitkovosti. (Marvan et al., 1992).

Na inervaci se podílí nervy z bederní pleteně a stydký nerv z křížové pleteně. Hlavním nervem je *nervus genitofemoralis*, který se rozvětňuje v parenchymu a v kůži vemene (Černý, 2002). Nadvemenní řasu inervuje *n. pudendalis* a inervaci parenchymu mléčné žlázy a hladké svaloviny ve stěně mlékovodů i ve stěně struků provádí autonomní plexus souběžný s arterií *pudendae externae* (Najbrt et al., 1982).

### 2.1.1.4 Lymfatický systém

Přes lymfatické tkáně je filtrována lymfa, která koluje v cévách a v místech filtrace se tvoří uzlíky – mízní uzliny. Mízní tkáň tvoří retikulární vazivo, ve kterém jsou přítomny makrofágy a lymfocyty. Funkce mízních uzlin je v těle nezastupitelná, protože fungují jako biologické filtry, které zbavují tělo škodlivých látek, mají významnou roli v imunitních procesech a některé uzliny se podílejí na metabolizaci tuků (Svobodová, 2014). Mezi orgány s převažující lymfatickou tkání patří brzlík, mandle, mízní uzliny a slezina.

Mízní řečiště vemene má s krevním systémem jistou obdobu a je bohatě vyvinuto. Dělí se na hluboký a povrchový mízní systém. V parenchymu mléčné žlázy

jsou roztroušeny mnohočetné hluboké mízní uzliny, které vedou lymfu z eferentní míznice do mízních uzlin (Toman et al., 2009). Povrchové míznice mízního systému vedou z kůže, podkoží a stěn struků lymfu do mízních uzlin (Najbrt et al., 1982).

### **2.1.1.5 Involuce**

Involuce je proces zmenšení parenchymu v období od zaprahnutí do dalšího porodu. Dochází ke snižování aktivity mléčné žlázy z důvodů její regenerace, která může být spojena s úplným zánikem některých sekrečních buněk a se zúžením všech vývodných cest, což vede k celkovému zmenšení mléčné žlázy. Úbytek žlázového parenchymu dosahuje až 30 % celkového objemu, který je však nahrazen zmnožením řídkého vaziva a tukové tkáně (Marvan et al., 1992).

Zpravidla se jedná o období dvou měsíců v průběhu březosti, kdy ustává sekrece mléka, avšak imunitní aktivita neustává, naopak je výraznější než před porodem, aby byla zajištěna předáním imunoglobulinů do mleziva kolostrální výživou mláďat (Toman et al., 2009). Zvýšení imunitní činnosti je pro toto období typické.

### **2.1.2 Fyziologické procesy mléčné žlázy**

Fyziologickým procesem v mléčné žláze se rozumí laktace neboli období produkce mléka. Produkce mléka probíhá ve třech postupných fázích, jedná se o sekreci, nahromadění a spuštění mléka. Produkce mléka trvá od porodu mláďat po zasušení. Divoká zvířata mají období laktace upravené podle toho, jak dlouho kojí mláďata, podobně jako je tomu u některých domácích zvířat. U hospodářských zvířat bylo pomocí selekce chovných jedinců s příslušnými předpoklady dosaženo prodloužení doby laktace a zvýšení množství vyprodukovaného mléka. U krávy trvá produkce mléka přibližně 300 dnů (Jelínek et al., 2009).

Pro správnou fyziologickou funkci je nutná regenerace mléčné žlázy skotu, která nastává během stání na sucho po předchozí laktaci. Stání na sucho je nutné pro následné kojení mláďat a pro další doживost (Hoedemaker et al., 2015).

Na sekreci mléka neboli laktaci se podílí celý metabolismus. Živiny se vytvářejí v játrech a krví jsou přepravovány do mléčné žlázy, kde se přeměňují na složky mléka. Nejvýznamnějšími složkami mléka jsou voda, mléčné bílkoviny, mléčný tuk, mléčný

cukr a minerální látky (Marvan et al., 1992). Na metabolismu těchto látek se podílí i nervový a endokrinní systém, který řídí pomocí hormonů tvorbu mléka. Již během březosti je mléčná žláza morfoloicky připravena k tvorbě mléka, ale spouštění mléka je pozdrženo až do období po porodu (Jelínek et al., 2009).

Těsně po porodu mláďat produkuje samice nejdříve mlezivo. Mlezivo má vyšší obsah bílkovin, tuků, minerálních látek a kolostrálních tělísek. Kolostrální tělíška jsou bílé krvinky produkující imunoglobuliny, které tak přenášejí pasivní imunitu od matky mláděti. Sáním mleziva jsou imunoglobuliny přenášeny přímo do krve bez degradace v trávicím traktu a tak chrání mládě před škodlivými účinky různých choroboplodných zárodků (Marvan et al., 1992).

Po ukončení produkce mleziva zahájí mléčná žláza sekreci mléka. Mléko je vodný roztok bílkovin, sacharidů, tuků a minerálních látek vyměšovaný buňkami s merokrinní a apokrinní sekrecí (Najbrt et al., 1982). Na produkci jednoho litru mléka je potřeba, aby přes mléčnou žlázu proteklo až 500 litrů krve (Jelínek et al., 2009).

U produkčních dojnic jsou vysoké nároky na množství vyprodukovaného mléka, které se mohou odrážet na chování zvířete, na jeho zhoršeném zdravotním stavu a vyšší náchylnosti k infekcím. U produkčních dojnic je snaha prodlužovat a zvyšovat užitkovost až nad fyziologickou hranici pomocí selekce, aby byla co nejvyšší využitelnost. Zvýšením užitkovosti se často zvyšuje i náchylnost k infekcím. Mléčná žláza je však vybavena obrannými mechanismy, které zabraňují průniku patogenů.

## **2.2 Obranné mechanismy**

Obranné mechanismy mléčné žlázy jsou nejučinnější, pokud jsou bakterie rozpoznány včas. Pokud je počáteční zánětlivá odpověď adekvátní, tak aby imunitní buňky urychleně odstranily infekci. Pak se funkce mléčné žlázy rychle vrátí do normálního stavu a to bez jakýchkoliv klinických příznaků. Neoptimální či nefunkční obrana mléčné žlázy může přispět k rozvoji akutního zánětu nebo k chronickým mastitidám, které mají nepříznivý vliv na množství a kvalitu mléka (Aitken et al., 2011). Hlavní funkcí obranných mechanismů mléčné žlázy je tedy ochrana proti průniku mikroorganismů, likvidace patogenů a nakonec obnova vlastní mléčné žlázy.

### **2.2.1 Mechanická obrana**

Za mechanickou obranu se dá považovat vše, co stojí mezi vnějším a vnitřním prostředím. Zejména se jedná o kůži a sliznice, které zabraňují přímému střetu se škodlivinami z vnějšího prostředí s tkáněmi těla, za obranu kromě kůže samotné lze můžeme považovat všechny kožní deriváty, dále potní a mazové žlázy. Naopak sliznice kryjí vnitřní povrch těla, kde produkují sekrety nebo enzymy. Existují například sliznice trávicích, dýchacích a močových cest, kutánní sliznice, která je v místech vyšší mechanické námahy, jako jsou například ústa, a endometrium, které vystýlá sliznici dělohy.

Kůže je tak vlastně typ bariéry, který se chrání částečně sám, vlastním ochlupením a vylučováním potu. Obranné mechanismy kůže zajišťují přirozenou neimunitní obranyschopnost organismu proti průniku infekce a mikroorganismů. Udržování integrity povrchu kůže a sliznic je tedy nezbytné (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Strojové dojení může vyvolat mechanické změny tkáně struků, narušit místní obranné systémy a zvýšit riziko infekcí (Smolenski et al., 2015). Strojní i ruční dojení může zvýšit náchylnost k infekci z důvodu opakovaného otevírání strukového kanálku a strukového svěrače. Je tedy nezbytné pečlivě monitorovat podtlak ve strukových násadcích a následně po vydojení struky ošetřit vhodnou dezinfekcí.

### **2.2.2 Buňky imunitního systému**

Buňky imunitního systému jsou zodpovědné za imunologickou reakci organismu. Mezi buňky imunitního systému mléčné žlázy patří polymorfonukleární neutrofil, eozinofil, NK buňky, monocyt, dendritické buňky a makrofágy.

#### **2.2.2.1 Polymorfonukleární neutrofil (PMN)**

Neutrofil je spolu s makrofágy primární fagocytující buňka mléčné žlázy skotu. Tvoří první obrannou linii při napadení patogeny. Fagocytující buňky musí postupovat rychle, aby minimalizovaly škody způsobené bakteriálními toxiny a jejich produkty. Jakmile jsou patogeny detekovány makrofágy, dojde k uvolnění chemoatraktantů z epiteliálních buněk mléčné žlázy a následuje migrace PMN do této

oblasti. Ochrana mléčné žlázy je účinná pouze tehdy, pokud dojde k rychlému přísunu PMN z krevního oběhu a následné fagocytóze a zničení bakterií. Neutrofilů mají krátkou životnost, přežívají přibližně 24 hodin a poté zanikají nekrotickou nebo apoptotickou (Toman et al., 2009).

Druhá linie obrany proti infekci se skládá ze sítě paměťových buněk a imunoglobulinů, které interagují s první linií obrany. Aby bylo poškození mléčné žlázy bakteriemi, toxiny a produkty uvolněnými z PMN minimalizováno, musí eliminace napadajících buněk postupovat rychle. Z tohoto důvodu je nutno odpovídajícím způsobem regulovat zánětlivou odpověď (Paape et al., 2002).

### **2.2.2.2 Eozinofilní granulocyty**

Eosinofily spolu s basofily a neutrofilů patří do skupiny bílých krvinek granulocytů. Jejich funkce je obdobná jako u ostatních granulocytů, podílejí se na fagocytóze patogenů při zánětlivých procesech.

Eosinofily se vyskytují v malém množství a tvoří méně než 1 % z celkového počtu bílých krvinek vyskytujících se v těle. Granulocyty tohoto typu byly pozorovány především při boji proti bakteriím a parazitům, u alergických onemocnění nebo při chronických zánětech (Toman et al., 2009).

### **2.2.2.3 NK buňky**

Podle klonální teorie se v organismu pro každý antigen vyskytuje klon buněk s vysoce specializovanými receptory, které mají vazebné místo pro tento konkrétní antigen. Klonální receptory se vytvářejí během zrání lymfocytů (Toman et al., 2009). NK buňky mají vývojově blíže spíše k T - lymfocytům než k B-lymfocytům (Hořejší, a Bartůňková, 2009).

NK buňky patří k buňkám nespecifické imunity, které umí rozpoznat pomocí klonálních receptorů cílové buňky. Jsou tedy přirozeně cytotoxické neboli „přirození zabíječi“. NK buňky jsou aktivovány buňkami napadenými virem nebo buňkami přeměněnými na nádorové. NK buňky selektivně rozpoznávají napadené buňky a zničí ty z nich, které jsou infikovány, na základě receptorů na povrchu (Sanchez-Correa et al., 2011).

Počty NK buněk u skotu se ve vzorcích mléka v průběhu dojení liší. Ze začátku dojení je počet buněk vyšší, poté se během dojení sníží a při dodojování znovu množství NK buněk vzroste. Největší rozdíl z hlediska počtu NK buněk způsobuje zánětlivý proces, při kterém se množství buněk zvýší (Ryšánek, 2007). Ve čtvrtém vzorku za limitní hodnotu považujeme  $100 \cdot 10^3 \text{ ml}^{-1}$  NK buněk (Hamann, 2003; Ryšánek, 2007).

#### **2.2.2.4 Monocyty**

Monocyty jsou spolu s makrofágy důležité buňky představující antigen pro T-lymfocyty. Z tohoto důvodu jsou základní součástí specifického imunitního systému (Hořejší a Bartůňková; 2009).

Monocyty mohou vycestovat do tkáně, ve které probíhá zánět, kde se diferencují v makrofágy. Zráním monocytů v makrofágy se zvyšuje počet lyzozomů, receptorů pro IgG a složky C3, dále se zvyšuje i schopnost fagocytózy a opsonizace (Toman et al., 2009). V případě, že monocyty nevycestují do tkáně a zůstávají v krvi, změní se na rezidentní monocyty. Tyto monocyty časem vycestují do různých tkání, kde je jejich funkcí vykonávat imunitní dozor v dané tkáni (Toman et al., 2009). Z celkového počtu leukocytů jsou monocyty zastoupeny v krvi skotu 5 % (Reece, 1998).

#### **2.2.2.5 Makrofágy**

Makrofágy jsou buňky vznikající přeměnou z monocytů po jejich vstupu do tkáně. Patří sem například Kufferovy buňky jater, aleveolární a perivaskulární plicní makrofágy, histiocyty pojiva, mikroglie CNS, mezangiální buňky, peritonetální a pleurální makrofágy, makrofágy mléčných splavů a makrofágy mléčné žlázy.

Makrofágy migrují do ohnisek zánětu například mléčné žlázy, kde vydrží 6 - 12 hodin a řídí jeho průběh. Tkáňové makrofágy jsou makrofágy, které se neuplatnily při zánětlivých reakcích. Tyto makrofágy se přemísťují do tkáně, kde vykonávají imunitní dozor a stávají se „rezidentními“ makrofágy (Toman et al., 2009).

Protože makrofágy hrají nejvýznamnější úlohu při regulaci zánětu mléčné žlázy, budou podrobněji rozebrány v následující kapitole.

## 2.3 Makrofágy mléčné žlázy

Jak již bylo naznačeno v předchozí kapitole, makrofágy hrají klíčovou roli v iniciaci zánětlivé obranné reakce, regulaci rozšíření zánětlivých procesů a při rezoluci zánětu. (Fujiwara et al., 2005).

Obranné funkce makrofágů se projevují různými způsoby. Mezi tyto formy řadíme nespecifickou ochranu, ochranu prostřednictvím fagocytózy a ochranu pomocí intracelulárního trávení (anonym, 2011). Kromě funkcí v nespecifické obraně makrofágy také hrají klíčovou roli ve specifickém imunitním systému, například při zpracování antigenu a prezentaci buněk pro T - buňky (Verschoor et al., 2012).

### 2.3.1 Obecná charakteristika makrofágů

Ve zdravé laktující mléčné žláze jsou makrofágy převládajícím typem buněk. Během časně fáze zánětu spojeného s bakteriální invazí do žlázy začnou pronikat neutrofilů, které vyvolávají zánětlivé mediátory v infikovaných žlázách. V tomto případě aktivované makrofágy provedou fagocytózu bakterií jako odpověď na bakteriální toxiny či metabolity (Riollet et al., 2002).

Následující tabulka podává přehled o jednotlivých typech buněk a jejich procentuálním zastoupení během všech tří období opakujících se u chovného skotu.

Tab. 1 Zastoupení somatických buněk během funkčního období mléčné žlázy

(Ryšánek, 2007)

Období	Celkový počet ( $10^3 / \text{ml}^1$ )	Makrofágy (%)	Neutrofilů (%)	Lymfocyty (%)
Laktace	200	60	12	28
Kolostrální	280	37	37	26
Aktivní involuce	1800	43	19	38

Z tabulky je zřejmé, že buňky vykazují odlišnou aktivitu dle období. Makrofágy jsou nejvýrazněji zastoupeny ve všech třech obdobích, ale nejvyšší podíl mají během fáze laktace. Neutrofily se nejvýrazněji zvýšily během kolostrální fáze a lymfocyty během involuce.

### **2.3.2 Struktura makrofágů**

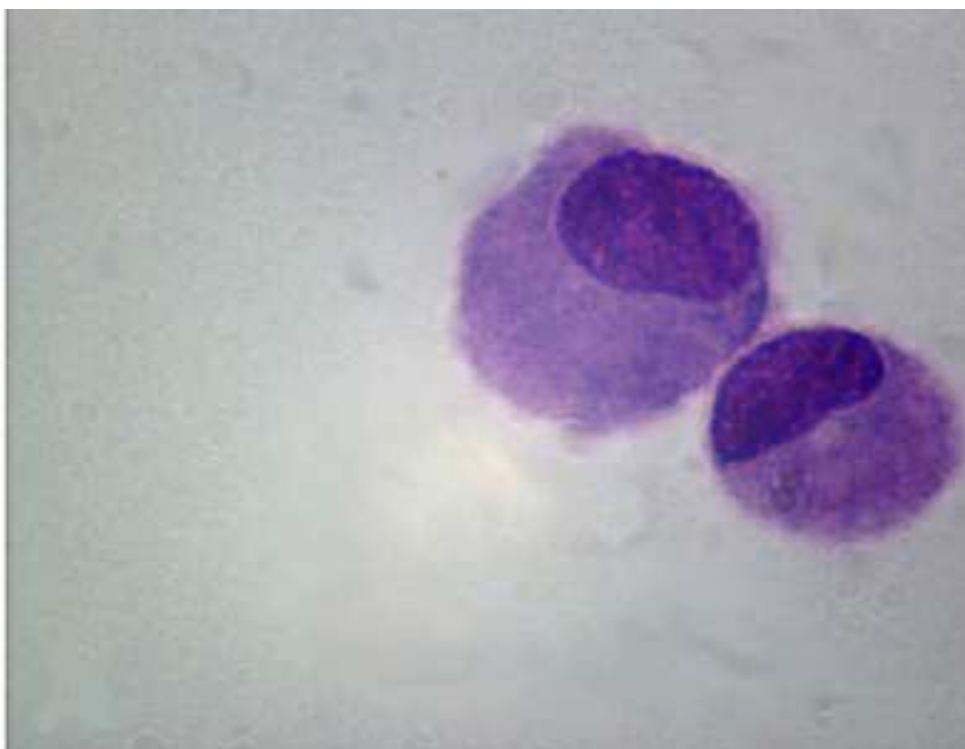
Makrofágy mléčné žlázy se rozlišují na základě své buněčné struktury na dva typy, a to nevakuolizovaný a vakuolizovaný typ. Kromě nevakuolizovaných makrofágů a vakuolizovaných typů lze pozorovat i jejich přechodné formy.

Nevakuolizovaný makrofág je monocytární typ s oválným jádrem, naplněným chromatinem, a má nejasně viditelnou basofilií a nevakuolizovanou cytoplazmu (Wardley et al. 1976). Z nevakuolizovaných makrofágů se stávají vakuolizované poté, co pohltní tukové kaseinové micely a tukové globuly nebo apoptické neutrofily.

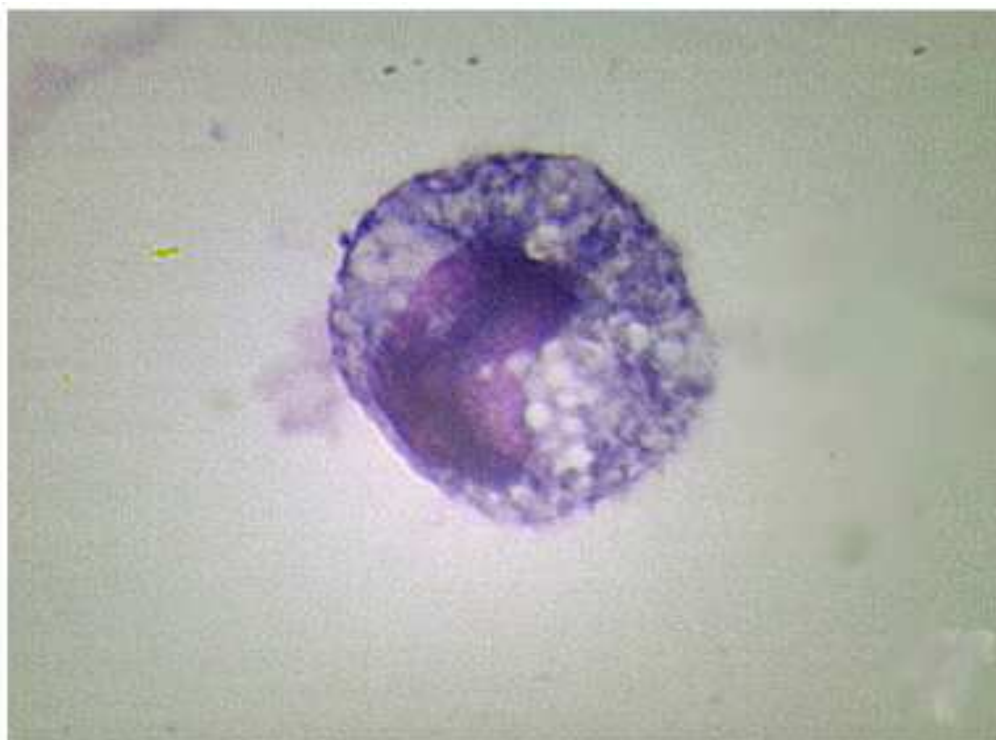
Vakuolizované makrofágy se strukturálně liší tím, že uvnitř obsahují oválné jádro ledvinového typu. Tyto makrofágy jsou bohaté na Golgiho komplex a mitochondrie. Obsahují velké množství lysozomů a vakuol v cytoplazmě. Vakuolizace je mimo jiné způsobena fagocytózou korpuskulárních částic plazmat aberantního mléka (Sládek, Ryšánek; 1999).

Jednotlivé typy makrofágů jsou znázorněny na následujících fotografiích pod světelným a transmisním mikroskopem, které byly převzaty z publikací autorů Sládek a Ryšánek (2010), kteří se podrobněji zabývají obranným systémem mléčné žlázy. Na obrázcích je zřetelně viditelný rozdíl ve strukturách obou typů makrofágů, poslední obrázek demonstruje pohlcení apoptických neutrofilů.

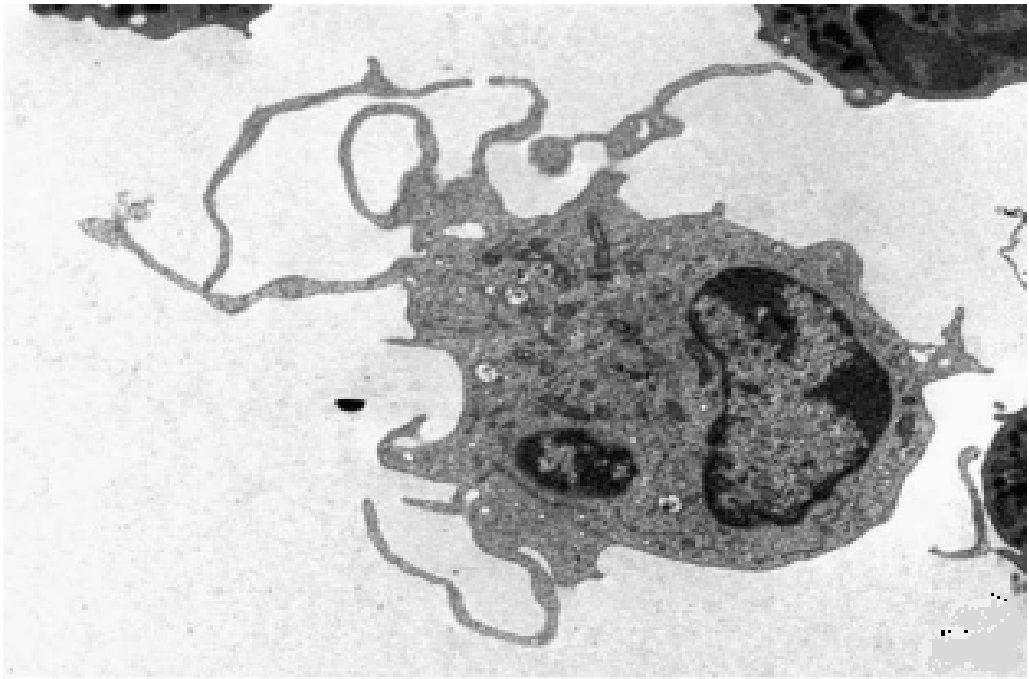




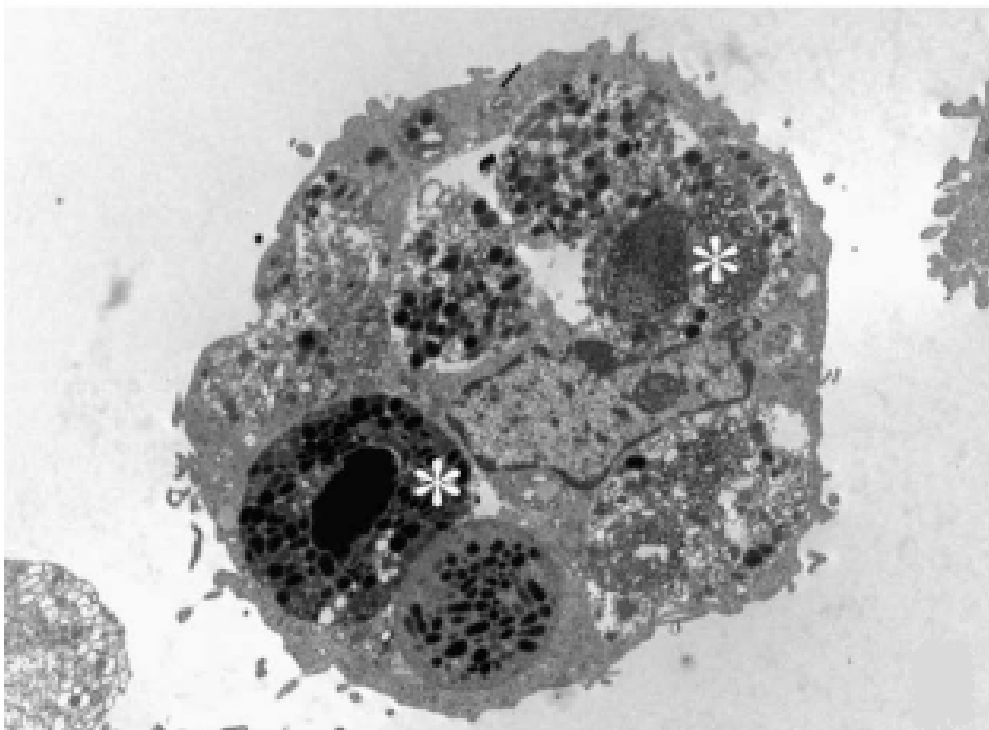
Obr. 1 Nevakuolizovaný makrofág mléčné žlázy skotu ve světelném mikroskopu



Obr. 2 Vakuolizovaný makrofág mléčné žlázy skotu ve světelném mikroskopu



Obr. 3 Nevakuolizovaný makrofág mléčné žlázy skotu v elektronovém mikroskopu



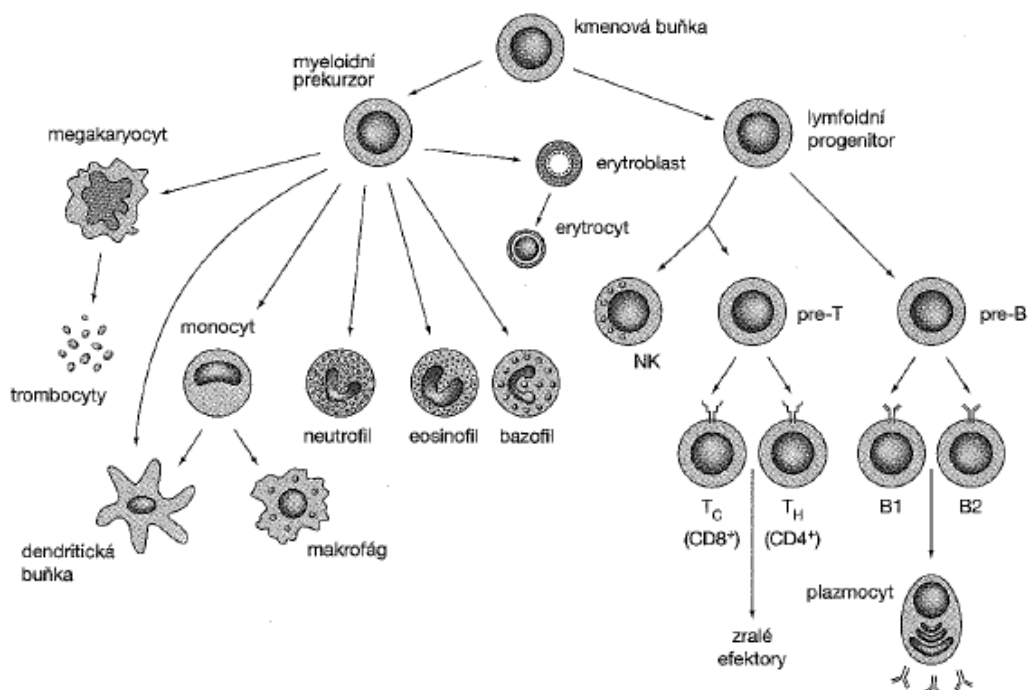
Obr. 4 Vakuolizovaný makrofág mléčné žlázy u skotu v elektronovém mikroskopu se znázorněním fagocytovaných apoptických neutrofilů (\*)

Během počáteční fáze zánětu mléčné žlázy byly pozorovány makrofágy s fagocytovanými apoptickými neutrofilů v cytoplasmě, tedy vakuolizované makrofágy. Tyto makrofágy dosáhly nejvyššího výskytu 48 - 72 hodin po indukcii zánětlivé reakce a podílely se na její rezoluci (Sládek, et al.; 2006).

### 2.3.3 Původ makrofágů

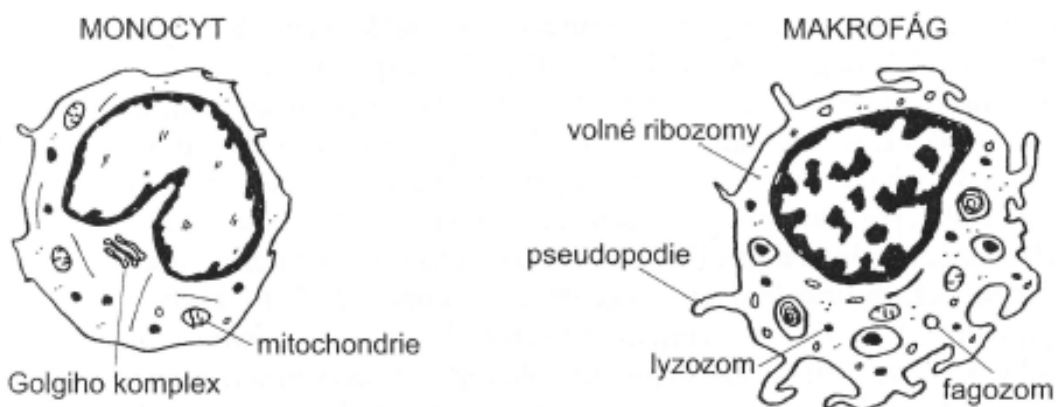
Krvetvorba se odehrává téměř výhradně v kostní dřeni, kde adhezivní molekuly umožňují, aby kmenové buňky mohly vyžrávat pod vlivem cytokinů, interleukinů a mnoha dalších transkripčních faktorů. Z kmenových buněk tak vznikají imunitní a krevní buňky (Doubek, 2003; Toman et al., 2009).

Monocyty, ze kterých následně vznikají při vycestování do tkání z krevního řečiště makrofágy, se tvoří z myeloidní linie hemopoetických kmenových buněk pod vlivem cytokinů proliferací a diferenciací na monoblasty a promonocyty (Toman et al., 2009). Myeloidní buňky dávají základ pro nespecifickou část imunitního systému, kam lze zařadit fagocytózu, produkci cytokinů a jiných nerozpustných mediátorů. Obrázek č.5 shrnuje vývojové cesty kmenové buňky podle různých linií (Hořejší a Bartůňková, 2009).



Obr. 5 Diferenciace různých druhů leukocytů z kmenové buňky

Buňka kostní dřeně se pod vlivem stimulačních faktorů, zejména CFU-GM, zhruba za 6 dnů diferencuje na monoblast, který se následně přeměňuje v promonocyt. Promonocyty jsou po čase vyplavovány do krevního řečiště, do krevního oběhu vstoupí jako monocyty, což jsou velké buňky s ledvinovým jádrem (Broide, 1987). Krevní monocyty jsou schopny vycestovat do tkání, ve kterých probíhá zánět, a mohou se dále diferencovat na „zánětlivé“ makrofágy. Při dozrávání monocytů v makrofágy se zvyšuje počet lysozomů, receptorů pro IgG a pro C3 složku. Zároveň se navyšuje schopnost fagocytózy a opsonizace. Rozdíly ve strukturách monocytů a makrofágů lze pozorovat na následujícím obrázku.



Obr. 6 Srovnání struktur monocytu a makrofágu

Z obrázků je zřejmé, že během vycestování monocytu z krevního řečiště do tkání proběhly změny v jeho struktuře a makrofág má oproti monocytům navíc lysozomy, fagozomy pro usnadnění natrávení buněk a pseudopodie pro zjednodušení pohybu.

#### 2.3.4 Funkce makrofágů

Hlavní funkcí makrofágů je schopnost fagocytovat bakterie, buněčný detritus a komponenty mléka. Důležité jsou i baktericidní vlastnosti makrofágů, zvýšení produkce cytokinů T-lymfocytů (IFN- $\gamma$  a GM-CSF) a opsonizace korpuskulárních antigenů. Dále makrofágy vyvolávají produkci protizánětlivých cytokinů TGF- $\beta$ , IL-10 (Toman et al., 2009).

Makrofágy se dělí dle funkcí na rezidentní, na zánětlivé a na alternativně aktivované (Sládek, Ryšánek; 2010), kterým se budu podrobněji věnovat v následující části.

### 2.3.4.1 Rezidentní makrofágy

Monocyty, které nevycestovaly z krve do tkání, se postupně pomocí exprese povrchových molekul mění na rezidentní monocyty. Po čase rezidentní monocyty vycestují do tkáně mléčné žlázy, kde působí jako rezidentní makrofágy (Toman et al., 2009). V mléčné žláze jsou rezidentní makrofágy převažujícími buňkami, působí jako „strážci“ při mastitidách, které jsou způsobovány patogeny a jejich toxiny. Bakterie způsobující infekci v tuboalveolách, přicházejí do kontaktu s makrofágy, které je rozpoznají a začnou spouštět protizánětlivou reakci (Paape et al., 2000).

V případě, že na produkci toxinů (chemotaktických látek) bakterií začnou makrofágy reagovat, za pomoci interleukinů (IL-8, IL-10, IL-6, IL-12) poté „přivolají“ další makrofágy. Každý interleukin reaguje na jinou bakterii za pomoci rozpoznávací funkce a na základě typu patogenu hladina interleukinů kolísá. Interleukiny se po uvolnění „rozprostřou“ po okolí, kde začnou prostupovat do tkání a kapilár. Právě v kapilárách neutrofilů reagují na prostupující interleukiny a pak migrují do tkáně mléčné žlázy, kde fagocytují bakterie.

U mléčné žlázy mají velký význam interleukin IL-6, který reaguje na bakterie *E. coli* a *S. aureus*, dále interleukin IL-8 a IL-10, které se zaměřují na bakterie *E. coli*, *M. bovis*, *S. aureus*, *S. uberis*, *K. pneumoniae*, *S. maecescens*, *P. aeruginosa* a interleukin IL-12, účinný proti patogenům *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens* a *S. uberis* (Bannerman, 2008).

Následující dva interleukiny mají největší vliv na makrofágy ve tkáních mléčné žlázy, ostatní mají pouze podpůrnou funkci.

- Interleukin 6 (IL-6) je produkován aktivovanými T<sub>H</sub> buňkami, makrofágy, monocyty a fibroblasty. U nádorových buněk funguje autokrinně a stimuluje buněčnou proliferaci. Stimuluje sekreci imunoglobulinů plazmatickými buňkami.
- Interleukin 8 (IL-8) je primárně sekretován monocyty a má různé účinky na neutrofilů. Za jeho přítomnosti například neutrofilů adherují k endoteliím cév a migrují z krve do tkání proti koncentračnímu spádu IL-8 (aktivní jsou již nanogramové koncentrace) (Kopecký, 2007).

Na rezidentní makrofágy mají velký vliv interleukiny, které upravují svoji hladinu podle typu patogenu, které napadají organismus. Dojde-li v organismu

k zánětlivým procesům, rezidentní makrofágy se aktivují na zánětlivé, aby byly schopny pohltit patogeny.

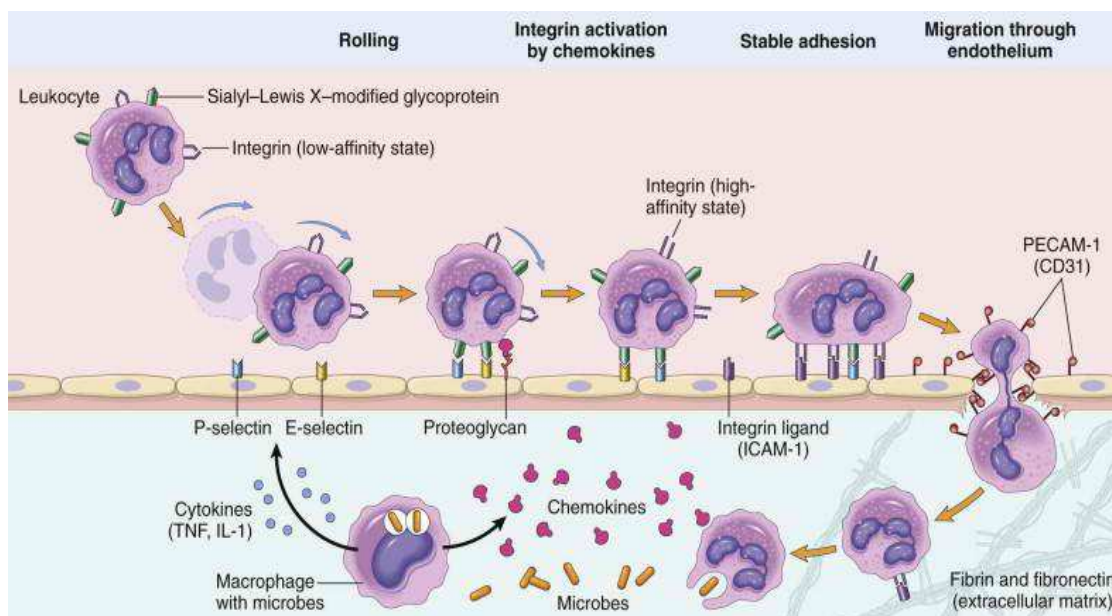
#### ***2.3.4.2 Zánětlivé makrofágy (klasicky aktivované a alternativně aktivované)***

Při zánětu jsou krevní monocyty schopné putovat do tkání, kde se mění na „zánětlivé“ makrofágy (Toman et al., 2009). Při rozpoznání patogenů způsobujících zánět makrofágy uvolní chemoreaktanty, které fungují jako chemický „posel“ a způsobí migraci PMN do tkání mléčné žlázy (Paape et al., 2000).

Neutrofilů a makrofágů nefagocytují jen bakterie, kvůli kterým migrovaly, ale i vlastní buňky, které jsou poškozené, staré nebo nefunkční (Paape et al., 2002). Pokud není dále potřeba fagocytóza prováděná neutrofilů, jsou neutrofilů naprogramovány k apoptóze (Savill, 1997) a „zánětlivé“ makrofágy, označované jako M1, se mění na alternativně aktivované makrofágy M2 (Yin et al., 2016).

Alternativně aktivované makrofágy mají za úkol fagocytovat apoptické neutrofilů, které se pro ně „zviditelní“ expresí tzv. „find me“ signálů. Jako eferocytóza se pak označuje schopnost alternativně aktivovaných makrofágů fagocytovat apoptické buňky (Savill, 1997). Aby mohly makrofágy správně fagocytovat a tím vyčistit okolí od apoptických neutrofilů, musí být aktivované alternativní cestou (Sládek, Ryšánek; 2000). Po dokončení vyčištění okolí mohou začít činnosti pro obnovu tkáně mléčné žlázy, která byla napadena patogeny (Savill, 1997).

Celý proces průchodu makrofágů a neutrofilů přes stěny cév do napadené tkáně je ilustrován na následujícím obrázku.



Obr. 7 Kroky extravazace zánětlivých buněk

Na obrázku je znázorněno schéma toho, jak funguje biochemická stopa a „cestování“ buněk při napadení patogeny, které podráždí již přítomné buňky. Ty začnou vyplavovat chemoreaktanty, které přivolají na pomoc další makrofágy a neutrofilů.

### 2.3.5 Osud makrofágů

V případě, že makrofágy mléčné žlázy naplní svou funkci a nejsou potřeba v systému, nastane čas, aby naplnily svůj „osud“. Tento proces nastává buď fyziologickou cestou prostřednictvím emigrace makrofágů nebo apoptózy, nebo patologickou cestou formou nekrózy makrofágů.

#### 2.3.5.1 Fyziologický zánik makrofágů

Nejsou-li makrofágy zapotřebí v tkáni mléčné žlázy, dojde zde k přeměně antigenu prezentující buňky. Makrofágy pak opouštějí danou lokalizaci, kde nejsou zapotřebí, a putují do sekundárních lymfatických uzlin (Krejsek, 2014). Tento jev se nazývá emigrace makrofágů a je alternativou k jejich zániku, tzv. apoptóze, která je hlavním tématem této práce.

Apoptóza se vyskytuje také jako obranný mechanismus, který je přítomen v imunitních reakcích organismu, pokud jsou buňky tkáně napadeny patogeny či jinými

škodlivými látkami bez ovlivnění celkové funkce tkáně (Norbury a Hickson, 2001). Během apoptózy buňky podstoupí aktivní a spontánní „sebevraždu“. Lze konstatovat, že většina fyziologických úmrtí buněk je ve skutečnosti realizována formou apoptózy (Kataoka et al., 1996).

#### **2.3.5.1.1 Apoptóza makrofágů**

Apoptóza makrofágů vlastně představuje fyziologickou smrt buněk, která je geneticky naprogramována. Proces programované buněčné smrti se obecně vyznačuje zvláštními morfologickými charakteristikami, které jsou energeticky závislé na různých biochemických mechanismech (Elmore, 2007).

Spouštěcím mechanismem apoptózy jsou především její induktory. Naopak inhibitory ji potlačují a brání tak vzniku apoptózy. Rovnováhu pro-apoptických a anti-apoptických faktorů je proto nutné regulovat.

Apoptóza může být indukována širokou škálou podnětů, které se vyskytují během normálních nebo patofyziologických procesů. Induktory pro apoptózu jsou charakteristické změnami v organismu, buď genetickými, nebo změnami vlivem vývoje organismu. Induktory apoptózy se rozdělují na vnější faktory jako je například stres, a na vnitřní faktory, mezi které patří poškození DNA, extracelulární a intracelulární exploze buněk nebo růstové faktory, jako jsou cytokiny (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) a glukokortikoidy. Fyziologický proces stárnutí patří také mezi proapoptické faktory (Chaloupka, 1996).

Buňky neustále „sledují“ své životní prostředí a trvale se „rozhodují“ o tom, zda by měly žít dál, aby se zabránilo předčasnému spuštění apoptózy, která není nezbytná, při konfrontaci inhibitoru s potenciální apoptotickou signální buňkou. Po celou dobu buňka potřebuje, aby byla apoptóza vyvolána jen v případě, že je signál velmi intenzivní. Toho je dosaženo rovnováhou pro- a anti-apoptických faktorů (Fulda, 2009; Busca et al., 2009).

Anti-apoptické faktory blokují podněty, které jsou schopny indukovat apoptózu v buňkách. Tyto buňky mají sníženou úroveň exprese několika genů kódujících anti-apoptické proteiny, jako jsou například galektinu 3, MCL-1 a BCL-XL, které patří do rodiny proteinu BCL-2, nebo enzymy, jako je sfingosin kináza-1 (Portt et al., 2011). Dále byly popsány tři detailně charakterizované anti-apoptické proteinové rodiny jako



jsou FLICE-inhibiční proteiny, BCL-2 a inhibitory apoptózy proteinů (IAP) (Busca et al., 2009).

Pokud je apoptóza inhibována, projevuje se několika základními způsoby: změnou struktury buněk, změnou biochemických procesů a genetickými změnami.

#### **2.3.5.1.1.1 Morfologické změny při apoptóze**

Morfologické změny při apoptóze představují sekvenci strukturálních změn vedoucích k programované smrti buňky. Časový sled dějů během apoptózy zahrnuje chromatinovou agregaci, jadernou a cytoplazmatickou kondenzaci, případně fragmentaci rozpadající se buňky do shluku segmentů, které často tvoří morfologicky neporušená tělíška. Tyto apoptická tělíška jsou rychle rozpoznána a fagocytována buď jinými makrofágy nebo sousedními buňkami epitelu (Denmeade et al., 2001).

První fází apoptózy je karyopyknosis, při které dochází ke změnám ve struktuře buňky. Tyto změny struktury se dají pozorovat na jádře, kde dochází k jeho svrašťování, a na chromatinu, který současně kondenzuje a shlukuje se do chomáčkovitých útvarů (Masopust, Průša et al.; 2003). Buňky se v této fázi zmenšují přibližně o 30 % buněčného objemu a o 10 % průměru buňky (Beauvais et al., 1995).

Při těchto změnách v buňce dochází k fragmentaci DNA na množství pravidelných úseků, které jsou příčinou přerušením dvoušroubovice, kterou již není možno za pomoci transkripce opravit (Masopust, et al.; 2003). Buňky také přicházejí o povrchové struktury, pseudopodia, a tím získávají hladký povrch (Wyllie et al., 1980).

Jádro buňky a jeho součásti zůstanou ucelené, ale cisterny endoplazmatického retikula se mohou dále rozšiřovat (dilatovat). Dilatované cisterny endoplazmatického retikula mohou splynout navzájem mezi sebou, čímž vytvoří vakuoly v cytoplazmě. Vakuoly se vyskytují malé nebo střední, ale výjimkou nejsou ani megavakuoly, které je možné častěji pozorovat při *in vitro* (Payne et al., 1994). Cisterny endoplazmatického retikula mohou také splynout s cytoplazmatickou membránou a tak vytvořit efekt „zpěnění“. Ten je typický pro druhou fázi apoptózy (Savill et al., 1989).

Druhá fáze apoptických změn, zeiosis, je doprovázena zmenšením apoptické buňky v důsledku úbytku vody spolu s elektrolyty. Druhá fáze „zpěnění“ cytoplazmy může probíhat současně se změnami při první fázi apoptózy. V důsledku úbytku vody

se membrána buňky scvrkává a tím na svém povrchu tvoří výběžky - vesikuly. Povrch buňky působí „naježeným“ dojmem, její vzhled je možno popsat jako „bublinky“.

V těchto fázích apoptózy buňka zesílí membránu, aby její okolí nebylo ohroženo lýzou aktivních enzymů, tzv. *crosslinking enzymes*, které by jinak katalyzovaly chemické změny ve svém okolí. Zesílením membrány dojde ke změnám v cytoskeletu, k dilataci cisteren endoplazmatického retikula, ke ztrátě schopnosti syntézy DNA a proteinu a tím k její degradaci (Masopust et al.; 2003). Při degradaci dojde většinou k rozdělení jádra, které tvoří oddělené části. Při prvním pozorování zeiotické buňky by tak mohla vypadat pro laika jako mnohjaderný element (Savill et al., 1989). Rozdělení jádra je důležité pro následnou tvorbu apoptických tělísek, které představují poslední fázi apoptózy.

V této poslední fázi dojde k rozpadu jádra zeiotické buňky a její následné fragmentaci do apoptických tělísek (Masopust, et al.; 2003). Velikost tělísek je přibližně 3  $\mu\text{m}$  a jsou postupně odstraňovány fagocytózou (Walker et al.; 1999). Nejčastěji jsou apoptická tělíška odstraňována fagocytózou makrofágy anebo jsou „pojídány“ sousedními buňkami. Pohlcení apoptických buněk není doprovázeno nežádoucími projevy, jako je tomu u nekrotických buněk.

#### **2.3.5.1.1.2 Biochemické změny při apoptóze**

Fagocyty rozpoznají, že má být buňka odstraněna, pomocí lektinu,  $\alpha$ - a  $\beta$ -integrinů nebo za pomoci fosfatidylserinu (Masopust, et al.; 2003). Při těchto změnách dochází například k štěpení proteinů nebo ke změnám v DNA. Buňky při apoptóze vykazují řadu biochemických změn, při kterých mají vliv kaspáza a fosfatidylserin.

Fosfatidylserin je nezbytný pro vývoj a diferenciaci různých orgánů v průběhu embryonálního vývoje, ale nikoliv přímo pro odstraňování apoptotických buněk. Je zodpovědný za detekci buňky určené k likvidaci a za přivolání fagocytujících buněk.

Fosfatidylserin, který je obvykle umístěn na vnitřní straně plazmatické membrány, je při apoptóze vystaven na vnějším povrchu a poskytuje rozpoznávací signál pro pohlcení fagocyty. Výsledkem apoptózy je pak rychlé a účinné odstranění nadbytečných nebo poškozených buněk (Wickremasinghe, 1999).

Fosfatidylserin může mít novou, neočekávanou vývojovou funkci jako důležitý gen pro diferenciaci. Fosfatidylserin není zapotřebí pro správnou funkci makrofágů, ale

na základě pozorování se zdá, že je nutný pro regulaci produkce cytokinů. Tyto výsledky jsou poněkud v rozporu s aktuálními názory, neboť receptor fosfatidylserin primárně funguje u apoptotických buněk (Böse et al., 2004).

Při apoptóze hraje ústřední roli aktivace kaspázy, protože kaspázy patří mezi klíčové komponenty biochemických drah. Dvě nejvíce prostudované dráhy aktivace kaspáz jsou dráhy pro receptory „smrti“ na povrchu buněk a mitochondriemi iniciované dráhy.

Na dráze receptoru „smrti“ na povrchu buněk probíhá aktivace kaspázy-8. Po aktivaci kaspáza vyvolává signalizační komplex, což je kritická událost vysílající signály smrti. Tato událost je regulována na několika různých úrovních různými virovými a savčími proteiny. Aktivované kaspázy-8 mohou aktivovat následně ostatní kaspázy přímým či nepřímým štěpením nebo indukci cytochromu *c* uvolňovaným z mitochondrií.

U mitochondriální iniciované dráhy je aktivace kaspázy spuštěna vytvořením multimerního komplexu cytochromu *c*, který je plně funkční v rekrutování a aktivování prokaspázy-9. Tato dráha je upravena v několika krocích, včetně uvolňování cytochromu *c* z mitochondrií, vyvázání a hydrolýzy ATP a inhibici aktivace kaspáz u proteinů, které patří k inhibitorům apoptózy (Budihardjo et al., 1999).

Tyto změny postupně vedou k fragmentaci DNA apoptické buňky, která je jedním z charakteristických znaků apoptózy. Vyskytuje se v reakci na různé apoptické stimuly v široké škále typů buněk. Molekulární charakterizace tohoto procesu identifikovala specifickou DNázu (CAD, kaspáza-aktivující DNase), která štěpí chromozomální DNA způsobem, který je závislý na kaspázách (Nagata, 2000).

### **2.3.5.1.1.3 Genetické změny při apoptóze**

Genetické změny při apoptóze jsou způsobeny zejména geny *ced-3*, *ced-4*, a *ced-9*, které kódují proteiny potřebné v apoptickém programu. Jejich úloha při apoptóze byla nejdříve identifikována při zkoumání hlístic *Caenorhabditis elegans*. Genetickou analýzou u nich byla prokázána pozitivní i negativní reakce (Hengartner et al., 1994).

Gen *ced-3* kóduje cysteinové proteázy, které jsou homologní s členy proteáz, které patří do rodiny kaspáz, které jsou zapojeny v apoptickém programu v savčích

buňkách. Pro aktivaci genu ced-3 je potřebný genový produkt ced-4. Tento krok k aktivaci je však blokován proteinem ced-9, který je homologní k proteinu BCL-2 u savců.

Pozorováním u hlístic bylo zjištěno, že BCL-2 může v blokování apoptózy nahradit gen ced-9 (Vaux et al., 1992, Hengartner et al., 1994). BCL-2 proteiny se aktivují prostřednictvím aktivování cytochromu c, v důsledku toho se vnější mitochondriální membrány stává propustnou (Desagher et al., 2000). Může proto dojít k průchodu enzymů přes buněčnou membránu a k jejímu označení pro fagocytózu makrofágy.

### ***2.3.5.2 Patologický zánik makrofágů***

Pokud nedojde k apoptóze nebo k emigraci makrofágů, nastává jejich patologický zánik, nekróza. Nekróza je alternativou k apoptické buněčné smrti, je ale považována za toxický proces, kdy buňka je pasivní obětí a následuje energeticky nezávislý způsob smrti.

Hlavními morfologickými změnami u nekrózy makrofágů jsou otok buněk, tvorba cytoplazmatických vakuol, nafouklé endoplazmatické retikulum, tvorba cytoplazmatických váčků, kondenzované, oteklé nebo prasklé mitochondrie, členění a odtržení polyribosomů, narušení membrány organel, oteklé a prasklé lysosomy a v neposlední řadě narušení buněčné membrány (Kerr et al., 1972; Trump et al., 1997).

Příčiny vedoucí k poškození buněk mohou být různé. Patří mezi ně faktory fyzikálního a mechanického původu, vliv chemických škodlivin a léčiv, infekční agens, imunologické reakce, genetické poruchy nebo následky nutriční nerovnováhy (Masopust, et al.; 2003). Například při studiu vlivu ATB na makrofágy byly v mléčné žláze zaznamenány degenerativní a nekrotické formy makrofágů (Lintner a Eberhart, 1990).

I když se apoptóza od nekrózy liší, existuje určitý překryv mezi těmito dvěma procesy. Apoptický proces může za určitých okolností přejít do nekrotického v důsledku snížení dostupnosti kaspáz a intracelulárního ATP. Zda se jedná o apoptózu či nekrózu záleží na povaze signálu buněčné smrti, typu tkáně, vývojové fázi tkáně a fyziologickém prostředí (Elmore, 2007).

### **2.3.5.3 Osud apoptotických makrofágů v mléčné žláze**

Obecně je hlavní rolí makrofágů likvidace starých a nepotřebných buněk, kterých se fyzicky zbavují fagocytózou. Dále udržují stálou homeostázu buněk, zabraňují produkci enzymatických a škodlivých látek. V mléčné žláze makrofágy mohou zanikat apoptózou, která se podílí na regulaci jejich životnosti. Avšak doposud nejsou základní biologické funkce makrofágů v mléčné žláze stále plně prostudovány (Sládek, Ryšánek; 2010).

Fyziologicky normální makrofágy jsou buňky, které přetrvávají v mléčné žláze až po několik týdnů (Bellingan et al., 1996). V tomto období emigrují postupně do supramamárních lymfatických uzlin, kde je potřeba makrofágy udržet životaschopné a plně funkční (Lee et al., 1980). Některé makrofágy mohou zpětně reemigrovat, ale část z nich odumře nekrózou ve tkáni mléčné žlázy (Sládek, Ryšánek; 1999). Bylo zaznamenáno, že kromě nekrózy mohou makrofágy podstoupit i lokální apoptózu.

Apoptóza byla pozorována u alveolárních, peritoneálních a pleurálních makrofágů v reakci na patogenní i nepatogenní podněty (Gonzalez-Mejia et al., 2009). Apoptické makrofágy jsou fagocytovány dalšími makrofágy a tím dojde k jejich fyzické eliminaci z mléčné žlázy (Sládek, Ryšánek; 2010).

Zmínění autoři rovněž popsali difference apoptózy u jednotlivých – morfologicky rozdílných makrofágů. Nevakuolizované formy makrofágů podstupovaly apoptózu v daleko menší míře, než vakuolizované makrofágy. Dále bylo významným zjištěním to, že rezidentní makrofágy podstupují apoptózu v daleko větší míře, než makrofágy zánětlivé. V poslední řadě je nutno zmínit, že apoptóza makrofágů vykazovala dynamiku v souvislosti s průběhem zánětlivé reakce mléčné žlázy. Během iniciace byl zaznamenán velmi nízký podíl apoptózy, který se zvyšoval v rezoluci (Sládek, Ryšánek; 2010).

## **2.4 Metody detekce apoptózy u makrofágů**

Apoptóza makrofágů je proces, který lze pozorovat s použitím širokého spektra metod. Jedná se o jednoduché metody, kam například patří mikroskopické pozorování. Známé jsou i sofistikovanější metody, mezi které se řadí kupříkladu průtoková

cytometrie nebo exprese genů. Kompletní výčet metod detekce apoptózy výrazně přesahuje rozsah kapitoly. Proto budou uvedeny pouze nejběžnější metody.

#### **2.4.1 Mikroskopické metody**

Mikroskopie jako metoda pozorování je používána téměř na všech stupních vzdělávacího systému. Zejména světelná mikroskopie tak představuje oblíbenou metodu pozorování menších částic, protože tento typ mikroskopů je standardní součástí vybavení většiny odborných pracovišť.

Pomocí světelné a elektronové mikroskopie byly identifikovány různé morfologické změny, které nastávají během apoptózy (Hacker, 2000). Jedná se o nejčastěji používanou metodu, protože jsou nejméně náročné na vybavení a relativně cenově dostupné. Světelnou mikroskopii jako metodu pro zjišťování apoptických makrofágů využili při svých výzkumech například Ponnusamy et al. (2012) a Nogueira et al. (2014), pozorování pod elektronovým mikroskopem dali přednost Monack (1997), Watanabe et al. (1985), a Park (2006). Makrofágy v mléčné žláze skotu byly rovněž předmětem studia za pomoci světelné mikroskopie (Sládek a Ryšánek, 2010).

Během časně fáze procesu apoptózy buňky se smršťují a objevuje se pyknosis viditelné pod světelným mikroskopem (Kerr et al., 1972). Smrštění buněk vede k tomu, že buňky jsou menší velikosti, dále je možnost pomocí mikroskopu pozorovat změny na cytoplazmě a organelách. Pyknosis je výsledkem kondenzace chromatinu, což je nejvíce charakteristický znak apoptózy. Podobné změny byly zaznamenány pomocí světelné mikroskopie také u makrofágů mléčné žlázy skotu (Sládek a Ryšánek, 2010).

Histologické vyšetření s použitím hematoxylinu a eozinofilního barviva umožní pozorovat apoptózu jednotlivých buněk, které na toto barvivo reagují jinak než okolní buňky. Apoptické buňky se jeví jako kruhový nebo oválný útvar s tmavou eozinofilní cytoplazmou a s hustým fialovým jaderným fragmentem chromatinu (Elmore, 2007).

Pomocí transmisní elektronové mikroskopie lze lépe definovat subcelulární změny. V rané kondenzační fázi chromatinu, kdy je jaderný materiál elektronově hustý, jsou pozorovatelné charakteristické agregáty umístěné periferně v jaderné membráně, i když tam může být také rovnoměrně husté jádro (Elmore, 2007).

## 2.4.2 Biochemické metody

Biochemické metody využívají různá činidla pro detekci apoptických buněk, které jsou následně označeny na svém povrchu. Posléze tak mohou být detekovány za použití průtokové cytometrie nebo pomocí metody TUNEL.

Mezi biochemické reakce patří exprese markerů buněčného povrchu, které umožňují rozpoznávání apoptotických buněk sousedními buňkami. Umožňují tak rychlou fagocytózu s minimálním kompromisem na okolní tkáň. Toho je dosaženo přesunem dovnitř směřujícího fosfatidylserinu z lipidové dvojvrstvy buňky na vnější vrstvu plasmatické membrány (Bratton et al., 1997). I když fosfatidylserin je známý ligand pro rozpoznávání fagocytů na povrchu apoptotické buňky, nedávné studie ukázaly, že i jiné proteiny jsou při odstranění apoptotických buněk také vystaveny na jejich povrchu.

Mezi proteiny viditelné na povrchu buněk také patří annexin I a kalretikulin. Annexin V je rekombinantní fosfatidylserin, který váže protein. Silně a specificky interaguje se zbytky fosfatidylserinu a může být úspěšně použit pro detekci apoptózy (Arur et al, 2003). Kalretikulin je protein, který se váže na protein s LDL-receptoru a spolupracuje s fosfatidylserinem jako signál pro jeho rozpoznávání (Gardai et al., 2005).

Pro následnou detekci apoptózy makrofágů označených Annexinem V lze využít fluorescenční mikroskopii nebo průtokovou cytometrii (Sládek a Ryšánek, 2010; Balvan et al., 2014). Průtoková cytometrie je metoda založena na analýze fyzikálních charakteristik, na vyšetřování částic unášených nosnou kapalinou a jejich interakcí se světelným zářením. Analyzovanými veličinami jsou velikost částic, granularita, neboli denzita jejich vnitřního obalu, a intenzita fluorescence. Měření probíhají v měřicí komoře, kde dochází k interakci buněk s laserovým paprskem. Po průchodu komorou jsou naměřené hodnoty přiřazeny k daným buňkám a uloženy pro další zpracování (Balvan et al., 2014). Značení buněk Annexinem V bylo spolu s průtokovou cytometrií použito k detekci apoptózy makrofágů mléčné žlázy skotu (Sládek a Ryšánek, 2010).

Další z metod detekce apoptických buněk je metoda TUNEL (Terminal dUTP Nick End-Labeling). Používá se k testu enzymatického štěpení u buněk se sníženou životností značením DNA zlomů (Kressel a Groscurth, 1994). Terminální transferáza se používá k označení na 3'-konec DNA fragmentů. Pomocí dUTP pak mohou být fragmenty DNA označeny různými sondami pro umožnění detekce pomocí světelné mikroskopie, fluorescenční mikroskopie nebo průtokové cytometrie (Elmore. 2007).

### 2.4.3 Genetické metody detekce

Za pomoci genetických metod lze odhalit geny, které jsou pro uskutečnění apoptózy nezbytné, jako jsou například ced-3, ced-4 a ced-9 (Huang et al., 2013). Umožňují tak přesněji pochopit principy genetických změn během apoptických procesů.

Nejčastěji používanou metodou genetické detekce je metoda PCR (polymerázová řetězová reakce), kterou lze detekovat geny podílející se na spuštění apoptózy. PCR je jednoduchý enzymatický test, který umožňuje amplifikaci specifického fragmentu DNA. Pro zmnožení je zapotřebí dodat primery, které chemicky označí vyhledávaný úsek a ten se bude dále amplifikovat. Stačí stopové množství požadované DNA, aby bylo možno vyrobit dostatek kopií pro analýzu pomocí laboratorních metod (Garibyan et al., 2013). Tato metoda je náročná na přípravu, ale její výsledky jsou velmi přesné.

Závěrem lze konstatovat, že nejčastěji využívanou metodou pozorování apoptických buněk je metoda mikroskopická, protože pro cvičené oko je poměrně jednoduché pozorovat změny v buňce a tím odhalit jejich apoptózu. U biochemické metody je zase vyšší jistota správnosti měření, při odhalování pomocí moderního vybavení je menší riziko lidské chyby, protože sám přístroj si buňky při průtokové cytometrii vytřídí a označí. Genetické metody jsou nejméně využívané, protože jsou nákladné a komplikované. Nicméně jejich úloha pro detekci genů, které se podílejí na apoptóze buňky, je nezastupitelná. Ideální stav je takový, kdy budou použity 2-3 metody detekce k objektivizování dosažených výsledků.



### 3 ZÁVĚR

Onemocnění, která mohou vzniknout při infekcích nebo nešetrném zacházení se zvířetem, mají vliv na produkci mléka a tím i na ekonomiku podniku, těmto nežádoucím vlivům je potřeba předcházet. Z tohoto důvodu se v mléce pravidelně sleduje zvýšený podíl buněk imunitního systému, jako jsou neutrofilů, eozinofilů, NK buňky, monocytů a makrofágů, které upozorňují chovatele na zvýšenou možnost výskytu zánětu ve tkáních a tím možnost vzniku mastitidních onemocnění.

Tato práce se zabývá především reakcemi nespecifické imunitní odpovědi organismu na invazi patogenů v prostředí mléčné žlázy skotu. Za tuto reakci odpovídají především makrofágy, ale také lymfocyty a polymorfonukleární neutrofilů. Detailněji se práce zaměřuje na makrofágy a jejich cyklem ve tkáni mléčné žlázy, protože v nespecifické imunitní odpovědi hrají nejdůležitější roli.

Aby bylo možno pochopit funkci makrofágů v tkáni mléčné žlázy, je třeba zmínit i její anatomii a fyziologické procesy, které v ní probíhají. Pak teprve je možno studovat obranné mechanismy, které se spouštějí při napadení patogeny. V případě mléčné žlázy skotu je strukový kanál nejčastějším místem možného vstupu patogenů, protože při dojení dochází k jeho opakovanému otevírání.

Při vstupu patogenů do mléčné žlázy jsou aktivovány makrofágy, které se přeměňují z krevních monocytů na tkáňové makrofágy přechodem z krevního řečiště do okolních tkání. Makrofágy jsou známé především svou schopností pohlcovat cizí tělesa vyskytující se v tkáních. V mléčné žláze proto fagocytují, kromě patogenů a jejich toxinů, i kaseinové micely a tukové globuly. Mimo fagocytózu jsou makrofágy důležité při regulaci zánětů mléčné žlázy, musí zasáhnout dříve, než přejde zánět do chronického průběhu, a tím prodlouží onemocnění mléčné žlázy.

Na konci svého životního cyklu makrofágy podstupují apoptózu, neboli programovanou buněčnou smrt. V apoptóze podobě pak mohou být fagocytovány jinými makrofágy a tím odstraněny z oběhu, aby nevypustily do okolního prostředí toxické látky, které by mohly poškodit tkáň. Mezi nejčastěji používané metody, které jsou používány pro detekci apoptóze u makrofágů, patří světelná a elektronová mikroskopie, průtoková cytometrie a metody jako je PCR.

## 4 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

AITKEN, S. L., C. M. CORL a L. M. SORDILLO. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2011, 291-304. DOI: 10.1007/s10911-011-9230-4.

ARUR S., U. E. UCHE, K. REZAUL, M. FONG, V. SCRANTON, A. E. COWAN, W. MOHLER a D. K. HAN. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev Cell*. 2003, (4), 587–98.

BALVAN, J., M. RAUDENSKÁ, M. MASARÍK a R. KIZEK. Analýza programované buněčné smrti průtokovou cytometrií. *Laboratory reports*. 2014, 60-63.

BANNERMAN, D., Paathogen -dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *Journal of animal science*, 2008, č. 87.

BEAUVAIS, F., L. CHEL. *Human eosinophils in culture undergo a striking and rapid shrinkage during apoptosis*. 1995, (57(6)).

BELLINGAN, G. J., H. CALDWELL, S. E. HOWIE, I. DRANSFIELD a C. HASLETT. In vivo fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammation: inflammatory macrophages do not die locally, but emigrate to the draining lymph nodes. *Journal Immunol*. 1996, (157(6)), 2577-2585.

BÖSE, J., A.D. GRUBER, L. HELMING, S. SCHIEBE a I. WEGENER. The phosphatidylserine receptor has essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal. *German Research Center for Biotechnology*. Německo, 2004, (3(4)). DOI: 15345036.

BRATTON, D. L., V. A. FADOK, D. A. RICHTER, J. M. KAILEY, L. A. GUTHRIE a P. M. HENSON. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-

mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *Journal Biol Chem.* 1997, (272), 26159–65.

BROIDE, D., Buňky zánětu. *Základní a klinická imunologie.* 1987, č. 9

BUDIHardJO, I., LUTTER, H. OLIVER, X. LUO a X. WANG. Biochemical Pathways of Caspase Activation During Apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* Texas, 1999, (11), 269-290. DOI: 10,1146.

BUSCA, A., M. SAXENA, A. KUMAR a M. KRYWORUCHKO. Anti-apoptotic genes in the survival of monocytic cells during infection. *Curr. Genomics.* 2009, (10), 306-317.

COWIE A. T., I. A. FORSYTH a I. C. HART. *Growth and Development of the Mammary Gland.* Berlín: Springer Berlin Heidelberg, 1980, 58-145. DOI: 10.1007/978-3-642-81389-4\_3.

ČERNÝ, H.. *Veterinární anatomie: pro studium a praxi.* 1. vydání. Brno: Noviko, a. s., 447s., 2002. ISBN 80-86542-05-X.

DOUBEK, J. *Veterinární hematologie.* 1. vydání. Brno: Novico, 446 s., 2003. ISBN 80-86542-02-5.

DENMEADE, S. R., B. TOMBAL a John T. ISAACS. *Apoptotic pathways in prostate cancer.* 2001, (6).

DESAGHER S. a J. C. MARTINOU. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Article in Trends in Cell Biology.* 2000, (10(9), 369-77. DOI: 10,1016 / S0962-8924 (00) 01803-1.

DUPREY, B. The cells and molecules of host defense. *StudyBlue* [online]. 2003 [cit. 2016-03-23]. Dostupné z: <https://www.studyblue.com/#flashcard/view/11708138>

ELMORE, S.. *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death: Toxicol Pathol*. Severní Karolína, USA, 2007, (35 (4), 495-516. DOI: 10,1080 / 01926230701320337.

FUJIWARA, N. a K. KOBAYASHI. Macrophages in Inflammation. *Current Drug Target -Inflammation & Allergy*. Německo, 2005, 281-286. DOI: 10,2174 / 1568010054022024.

FULDA, S. Tumor resistance to apoptosis. *Internacional Journal Cancer*. 2009, (124), 511-515.

GARDAI, S. J., K. A. MCPHILLIPS, S. C. FRASCH, et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell*. 2005, (123), 321-324.

GARIBYAN, L. a N. AVASHIA. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *Journal Invest Dermatol*. 2013, (133 (3). DOI: 10,1038/jid.2013.1

GONZALEZ-MEJIA M. E. A A. DOSEFF. Regulation of monocytes and macrophages cell fate. *Front Bioscience*. 2009, (14), 2413-2431. DOI: 10,2741 / 3387.

HACKER, G. *The morphology of apoptosis*. 2000, 301 s., 5-17.

HAMANN, J. *Definition of the Physiological cell count treshold based on changes in milk composition.: Mastitis Newsletter 25*. 2003, 9-12.

HENGARTNER H. O. a H. R. HARTVITZ. C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell*. 1994, (76(4), 665-76. DOI: 7907274.

HOEDEMAKER, M. a V. KRÖMKER. *Physiological processes in the mammary gland tissue of dairy cows during the dry period*. Berlín: Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2015, 76-83.

HOŘEJŠÍ V. a J. BARTUŇKOVÁ. *Základy imunologie*. 4. vydání. Praha: TRITON, 260 s., 2009. ISBN 978-80-7387-280-9.

HUANG, W., T. JIANG, W. CHOI, et al. Mechanistic insights into CED-4-mediated activation of CED-3. *Genes & Dev.* 2013, (27), 2039-2048. DOI: 10.1101/gad.224428.113.

HUSVÉTH, Francis. Maďarsko: Pannon University, 2011

CHALOUPKA, J. Programovaná smrt buňky. *Biologické listy*. 1996, (61(3-4)), 2479-271.

*Imunology - blood cells: macrophages* [online]. Under microscope, 2011 [cit. 2016-03-13]. Dostupné z: [http://www.under.microscope.com/lifeforms/animal\\_cells/blood\\_cells/macrophage/](http://www.under.microscope.com/lifeforms/animal_cells/blood_cells/macrophage/)

JELÍNEK P., K. KOUDELKA a KOLEKTIV. *Fyziologie Hospodářských zvířat*. 1. vydání. Brno: Mendlova zemědělská a lesnická univerzita, 2009. ISBN 80-7157-644-1.

KATAOKA, S. a T. TSURUO. Physician Education: Apoptosis. *Ocologist*. Tokyo, Japonsko: Pharmaceutical Research Institute, Kirin Brewery Co., Ltd., 1996, (1(6)), 399-401. DOI: 10388021.

KERR, J. F., A. H. WYLLIE a A. R. CURRIE. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 1972, (26(4)), 239-257.

KÖNING, H. E. A H. G. LIEBICH. *Anatomie domácích savců: Splachnologie, cévní a nervová soustava*. 2. vydání. Bratislava: Hajko a Hajková, 2002. ISBN 80-88700-57-4.

KOPECKÝ, J. *Cytokiny/Humorální odpověď: Imunologie* [online]. 2007, (7) [cit. 2016-03-13]. Dostupné z: [http://rum.prf.jcu.cz/public/kopecky/07/07\\_Cytokiny\\_huoralni\\_odp.rtf](http://rum.prf.jcu.cz/public/kopecky/07/07_Cytokiny_huoralni_odp.rtf)

KREJSEK, J. Glatiramer acetát – protizánětlivé a neuroprotektivní mechanismy účinku. *Remedia*. Praha, 2014, (24), 464-467.

KRESSEL M., Groscurth P. Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. *Cell Tissue Res*. 1994;278:549–56.

LEE, C. S., F. B. WOODING a P. KEMP. Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows. *The Journal of dairy research*. 1980, (47(1), 39-50. DOI: 10.1017/S0022029900020860.

LINTNER, S., EBERHART, R. J. (1990): Effect of antibiotics on phagocyte recruitment, function, and morphology in the bovine mammary gland during the early nonlacting period. *American Journal of Veterinary Research*, 51: 533-542.

MARVAN, F. A KOLEKTIV. *Morfologie hospodářských zvířat*. Praha: Brázda, 303 s, 1992. ISBN 80-209-0273-2.

MASOPUST, J., R. PRŮŠA, P GOETZ, V. PELOUCH a T. ZIMA. *Patobiochemie buňky*. 1. vydání. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 2003. ISBN 80-239-1011-0.

MIHOLOVÁ B. A D. LIPSKÝ. *Anatomie a fyziologie hospodářských zvířat*. 1. vydání. Praha: SZN, 258 s., 1976. ISBN 18743/75-211.

MONACK, D. M. *Yersinia signals macrophages to undergo apoptosis and Yop J is necessary for this cell death*. 1997, (sv. 94, č. 19), 10385-10390.

NAGATA, S. Apoptotic DNA Fragmentation. *Apoptotic DNA Fragmentation*. 2000, (256,1), 12-18. DOI: 10,1006/ecr.2000.4834.

NAJBRT, R. a KOLEKTIV *Veterinární anatomie 2*. 1. vydání. Praha: SZN, 441 s., 1982. ISBN 07-006-82.

NOGUIERA, D. R., M. MITJANS, a M. VINARDELL. *Mechanisms Underlying Cytotoxicity Induced by Engineered Nanomaterials: A Review of In Vitro Studies*. 2014, (4(2)), 454-484. DOI: 10.3390/4020454.

NORBURY, C. J. a I. D. HICKSON. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001, (41), 367–401.

PAAPE, M. J., K. SHAFER-WEAVER a A. V. CAPUCO. Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. *Advances in experimental medicine and biology*. 2000, 259-77. DOI: 10959434.

PAAPE, M. a J. MEHRZAD a X. ZHAO. Defense of the Bovine Mammary Gland by Polymorphonuclear Neutrophil Leukocytes. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* [online]. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, 2002. DOI: 10.1023/A:1020343717817, pp 109-121.

PARK, J. S. Electron micrographs of murine macrophages infected by *M. tuberculosis* strain CSU21 (A) and CSU22 (B–D). *Journal of leukocyte biology*. 2006, (79), 80-86.

PAYNE C. M., L. GASSER, M. E. TISCHLER a D. WYCKLOFF. Programmed cell death of the normal human neutrophil: an in vitro model senescence. *Microsc. Rec. Techn.* 1994, (28), 327-344.

PONNUSAMY, D. a K. D. CLINKENBEARD. *Yersinia pestis* intracellular parasitism of macrophages from hosts exhibiting high and low severity of plague. 2012.

PORTT, L., G. NORMAN, C. CLAPP, M. GREENWOOD a M. T. GREENWOOD. Anti-apoptosis and cell survival. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2011, (Volume 1813, 1), 238-259. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2010.10.010.

REECE, William O. *Fyziologie domácích zvířat*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 1998. ISBN 80-7169-547-5.

RIOLLET, C., P. RAINARD a B. POUTREL. *Cells and Cytokines in Inflammatory Secretions of Bovine Mammary Gland* [online]. 2002, pp 247-258 [cit. 2016-02-24]. DOI: 10.1007/0-306-46832-8\_30.

RYŠÁNEK, D. *Somatické buňky v mléce* [online]. 2007 [cit. 2016-02-28]. Dostupné z: [http://old.vri.cz/userfiles/image/pracovnici/Rysanek/kapit\\_predn/Somaticke\\_bunky\\_v\\_mlece.pdf](http://old.vri.cz/userfiles/image/pracovnici/Rysanek/kapit_predn/Somaticke_bunky_v_mlece.pdf).

SANCHEZ -CORREA, B. a KOLEKTIV. *Human NK cells in acute myeloid leukaemia patients: analysis of NK cell-activating receptors and their ligands* [online]. Springer-Verlag, 2011 [cit. 2016-02-24].

SAVILL, J. S., P. M. HENSON a C. HASSLETT. Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel "charge-sensitive" recognition mechanism. *Journal Clin Invest.* 1989, (84(5)).

SAVILL, J. Apoptosis in resolution of inflammation. *Journal Leukoc Biology.* 1997, 375-80. DOI: 9103222.

SLÁDEK, Z. A D. RYŠÁNEK. Apoptosis of resident and inflammatory macrophages before and during the inflammatory response of the virgin bovine mammary gland. *Acta Vet Scand.* BioMed Central Ltd, 2010, (12), 52. DOI: 10.1186/1751-0147-52-12.

SLÁDEK, Z. A D. RYŠÁNEK. Apoptosis of polymorphonuclear leukocytes of the juvenile bovine mammary gland during induced influx. *Vet. Res.* 2000, (Volume 31, Number 6), 553-563. DOI: 10,1051 / vetres: 2000139.

SLÁDEK, Z. A D. RYŠÁNEK. Expression of macrophage CD44 receptor in the course of experimental inflammatory response of bovine mammary gland induced by lipopolysaccharide and muramyl dipeptide. *Veterinary Science 2009* [online]. 2009, (86), 235-240 [cit. 2016-02-24].



SLÁDEK, Z., H. RÝZNAROVÁ a D. RYŠÁNEK. *Macrophages of the bovine heifer mammary gland: Morphological features during initiation and resolution of the inflammatory response*. Berlín: Blackwell Verlag, 2006, 116-124. DOI: 10.1111/j.1439-0264.2005.00647.x.

SLÁDEK, Z. A D. RYŠÁNEK. Ultrastructure of phagocytes from mammary glands of non-pregnant heifers. *Anatomia, histologia,embryologia*. 1999, (28(5-6)), 291-297. DOI: 10.1046/j.1439-0264.00208.x.

SMOLENSKI, G. A., R. T. CURSONS, B. C. HINE a T. T. WHEELER. Keratin and S100 calcium-binding proteins are major constituents of the bovine teat canal lining. *Vet Res*. 2015, (46: 113). DOI: 10.1186/s13567-015-0227-7.

SVOBODOVÁ, I. *Vybrané kapitoly z veterinární prohlídky jatečných zvířat*. Brno: VFU, 2014, 28-33. ISBN: 978-80-7305-691-9.

TOMAN, M. a KOLEKTIV. *Veterinární imunologie*. 2., doplněné a aktualizované vydání. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2464-5.

TRUMP, B. F., I. K. BEREZESKY, S. H. CHANG a P. C. PHELPS. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol*. 1997, (25(1)), 82-88.

VAUX, D. L., I. L. WEISSMAN a S. K. KIM. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science*. New York, 1992, (258 (5090)), 1955-7. DOI: 1470921.

VERSCHOOR, C. P., A. PUCHTA a D. M. BOWDISH. The macrohages. *Methods in moleculat biology*. 2012, 139-156. DOI: 10.1007/978-1-61779-527-5\_10.

Vyhláška o veterinárních kontrolách při obchodování se živočišnými produkty. In: *373/2003 Sb. ČR*, 2003, číslo 373.

WALKER, P. R., J. LEBLANC, B. SMITH, S. PANDEY a M. SIKORSKA. Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis. *Methods (San Diego, Calif.)*. 1999, (17 (4), 329 -338. DOI: 10196104.

WARDLEY, R. C., B. T. ROUSE a L. A. BABIUK. The mammary gland of the ox: A convenient source for the repeated collection of neutrophils and macrophages. *Journal of the reticuloendothelial society*. 1976.

WATANABE, K., T. HORIGUCHI a F. SASAKI. Scanning electron microscopy of macrophages in the tail musculature of the metamorphosing anuran tadpole, *Rana japonica*. *Cell and Tissue Research*. 1985, (is. 3), 545-550.

WICKREMASINGHE, R. G. a A. V. HOFFBRAND. Biochemical and Genetic Control of Apoptosis: Relevance to Normal Hematopoiesis and Hematological Malignancies. *Blood journal*. 1999, (Blood: 93 (11).

WYLLIE, A. H., J. F. KERR a A. R. CURRIE. Cell death: the significance of apoptosis. *International review of cytology*. 1980, (68). DOI: 7014501

YIN, X. a C. PANG. Adipose-derived stem cells promote the polarization from M1 macrophages to M2 macrophages. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*. Čína, 2016. DOI: 32(3):332-338.

*Zootechnika.cz: Mléčná žláza* [online]. WebSlice, 2013 [cit. 2016-03-13]. Dostupné z: <http://www.zootechnika.cz/clanky/zaklady-chovatelstvi/obecna-zootechnika/zootechnika/mlecna-zlaza.html>

## 5 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

### Obrázek 1

Nevakuolizovaný makrofág mléčné žlázy skotu ve světelném mikroskopu .....19  
(Sládek a Ryšánek; 1999)

### Obrázek 2

Vakuolizovaný makrofág mléčné žlázy skotu ve světelném mikroskopu ..... 19  
(Sládek a Ryšánek; 1999)

### Obrázek 3

Nevakuolizovaný makrofág mléčné žlázy skotu v elektronovém mikroskopu ..... 20  
(Sládek a Ryšánek; 2009)

### Obrázek 4

Vakuolizovaný makrofág mléčné žlázy u skotu v elektronovém mikroskopu ..... 20  
(Sládek a Ryšánek; 2009)

### Obrázek 5

Diferenciace různých druhů leukocytů z kmenové buňky ..... 21  
(Hořejší a Bartůňková; 2009).

### Obrázek 6

Srovnání struktur monocyty a makrofágu ..... 22  
(Toman, 2009).

### Obrázek 7

Kroky extravazace zánětlivých buněk ..... 25  
(Duprey, 2003)

### Tabulka 1

Zastoupení somatických buněk během funkčního období mléčné žlázy ..... 17  
(Ryšánek, 2007)