

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ  
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**BRNO 2016**

**MICHALA STEINEROVÁ**

**Mendelova univerzita v Brně**  
**Agronomická fakulta**  
**Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat**

---



Agronomická  
fakulta

Mendelova  
univerzita  
v Brně



**Role polymorfonukleárních leukocytů během zánětlivé  
odpovědi mléčné žlázy skotu**

Bakalářská práce

*Vedoucí práce:*

prof. MVDr. Zbyšek Sládek, Ph.D.

*Vypracovala:*

Michala Steinerová

---

Brno 2016

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem práci na téma „Role polymorfonukleárních leukocytů během zánětlivé odpovědi mléčné žlázy skotu“ vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité 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 *Směrnici 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**

Tímto bych ráda poděkovala prof. MVDr. Zbyšku Sládkovi, Ph.D. za jeho cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích a vypracování této bakalářské práce. Dále chci poděkovat své rodině za podporu během celého studia.

## **Abstrakt**

Mléčná žláza je významným produkčním orgánem v chovu dojného skotu. Vlivem šlechtitelských a hybridizačních programů dosáhla pozice vysoce funkčně exploatovaného orgánu, což ohrožuje její integritu a homeostázu. Nejčastějším zdravotním problémem dojných krav jsou záněty mléčné žlázy. Proto během evoluce došlo k vytvoření jednoho z nejvýznamnějších obranných mechanismů, zánětlivé odpovědi. Ta se rozděluje na dvě stádia – stádium iniciace a rezoluce. V obou těchto stádiích hrají důležitou roli polymorfonukleární leukocyty (PMN). Ty migrují z krevního řečiště, adherují na stěnu kapilár, diapedezí se dostávají skrze ně a cestují do místa zánětu. Zde nastává eliminace patogenů skrze fagocytózu. Následně dochází k reparaci poškozené tkáně. PMN podstupují apoptózu a jsou fagocytovány makrofágy. Proto cílem této bakalářské práce bylo prostudovat a zpracovat doporučenou literaturu do podoby rešerše, která by sumarizovala poznatky v oblasti role PMN během zánětlivé odpovědi mléčné žlázy skotu.

**Klíčová slova:** mléčná žláza, polymorfonukleární leukocyty, zánětlivá odpověď, migrace

## **Abstract**

The mammary gland is an important production body in dairy cattle breeding. Due to breeding and hybridization programs it reached a position of highly functional exploitation body, which threatens its integrity and homeostasis. The most common health problem of dairy cows is mastitis. As a result, during the evolution, one of the most important defence mechanisms was created – an inflammatory response. It is divided into two stages - stage of initiation and resolution. In both of these stages, polymorphonuclear leukocytes (PMN) play very important role. They migrate from the bloodstream, adhere to the capillary walls, they get through them by diapedesis, and travel to the site of inflammation. There the elimination of pathogens through phagocytosis takes place. Then the damaged tissue is repaired. PMNs undergo apoptosis and they are phagocytosed by macrophages. Therefore, the aim of this work was to study recommended literature and to compile it into the literary research, which would summarize all findings about PMN's role during the inflammatory response of bovine mammary gland.

**Keywords:** mammary gland, polymorphonuclear leukocytes, inflammatory response, migration

# OBSAH

1 ÚVOD .....	7
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	8
2.1 Anatomie a fyziologie mléčné žlázy .....	8
2.2 Charakteristika obranného systému mléčné žlázy .....	9
2.2.1 Obranná funkce kůže a sliznic .....	9
2.2.2 Drenáž mléčné žlázy .....	10
2.2.3 Uzavíratelnost strukového kanálku .....	10
2.2.4 Keratin .....	10
2.2.5 Laktoferin .....	10
2.2.6 Laktoperoxidáza-thiokyanát-hydrogen-peroxidový systém .....	11
2.2.7 Komplementový systém .....	11
2.2.8 Makrofágy .....	11
2.2.9 Neutrofilý (Polymorfonukleární leukocyty) .....	12
2.2.10 Lymfocyty .....	12
2.2.11 Imunoglobuliny .....	12
2.3 Zánětlivá odpověď .....	12
2.4 Polymorfonukleární leukocyty (PMN) .....	14
2.4.1 Vývoj .....	14
2.4.2 Struktura v periferní krvi .....	16
2.4.3 Migrace PMN z krevního řečiště do místa zánětu .....	17
2.4.3.1 Chemotaxe .....	17
2.4.3.2 Adheze .....	18
2.4.3.3 Diapedeze .....	19
2.4.3.4 Fagocytóza .....	21
2.4.3.5 Apoptóza .....	23
2.4.3.6 Nekróza .....	25
3 ZÁVĚR .....	27
4 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	29

## 1 ÚVOD

Mléko je nejen významnou potravinou ve výživě člověka a zvířat, ale i nezastupitelným zdrojem živin pro mládě. U takto cenné suroviny hrají důležitou roli faktory, které by mohly jeho množství a kvalitu ovlivnit. Těchto faktorů je celá řada, ovšem jedním z nejdůležitějších je celková péče o zdraví zvířete. Ta nesouvisí pouze s welfare (pohodou), ale i s ekonomikou chovu.

Vlivem šlechtitelských a hybridizačních programů dosáhla mléčná žláza (MŽ) pozice vysoce funkčně exploatovaného orgánu, neboť na začátku laktace je u vysokoprodukčních zvířat produkce mléka i několik desítek litrů denně. Je zřejmé, že takto vytížené orgány jsou ve vyšší míře náchylnější k onemocněním, poruchám funkcí a fyzickému poranění, proto může snadno dojít k narušení homeostázy. Z tohoto důvodu je nutné, aby byly vyvinuty obranné mechanismy, které mají za úkol vytvořit účinný štít proti invazním bakteriím, dále pak schopnost eliminace zdrojů onemocnění a reparace poškozené tkáně. V případě obrany mléčné žlázy to jsou rezidentní obranné mechanismy obsahující nespecifickou obranu, do které patří kůže a sliznice, strukový kanálek, ale i samotný proces dojení. Ovšem tato obrana je mnohdy nedostatečná a v takovém případě nastupuje buněčná imunita zprostředkovaná leukocyty, především makrofágy, lymfocyty, NK buňkami a neutrofilními granulocyty, které hrají důležitou roli v jednom z nejvýznamnějších mechanismů obrany, zánětlivé odpovědi. Ta je z hlediska průběhu rozlišována na akutní a chronickou, přičemž chronickou se stává při perzistenci infekce a pokud je fyziologický proces hojení narušen.

Při akutní zánětlivé odpovědi dochází k rychlé obranné reakci organismu s cílem destrukce a odstranění poškozujících agens a následné reparace tkáně MŽ. Celý proces začíná influxem polymorfonukleárních leukocytů (PMN) do místa zánětu, který představuje obrovskou zátěž v narušení vlastních struktur v podobě různých enzymů, rozkladem vaziva. Aby akutní zánět proběhl co nejrychleji, musí se PMN vypořádat s patogeny pomocí fagocytózy, což je pohlcení a digesce. Následně je nutné tyto patogeny eliminovat. V případě úspěšné eliminace se MŽ vrací do původního stavu tak, že dochází k reparaci. Prvním krokem je odstranění PMN z místa poškození, aby akutní zánět nepřešel do chronického stavu a došlo k opětovné tvorbě nezávadného mléka.

Proto je tato práce zaměřena na popis průběhu zánětlivé odpovědi mléčné žlázy skotu, se zřetelem na roli PMN v tomto procesu.

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Anatomie a fyziologie mléčné žlázy

Mléčná žláza, u hospodářských zvířat nazývaná také vemeno, se nachází ve stydké krajině na spodině břicha. U mléčných plemen může tento orgán dosahovat hmotnosti 20-25 kg. Díky této vysoké hmotnosti je mléčná žláza upevněna pomocí závěsného ústrojí skládající se ze dvou mediálních, dvou laterálních listů a od nich odstupujících 7-8 sekundárních listů (Marvan et al., 1992).

Mezivemenná brázda rozděluje v mediální rovině vemeno na pravou a levou polovinu. Tyto poloviny jsou dále pomocí příčných brázd děleny na přední a zadní čtvrtě (Najbrt et al., 1982). Vrchol každé čtvrtě je protažen ve struk, kterým vede strukový kanálek. Tento kanálek přechází dál v mléčnou cisternu, což je dutina, která vyplňuje struk v jeho podélné délce a zasahuje až do žláznatého tělesa (Holub et al., 1969). Žláznaté těleso neboli parenchym je nejdůležitější součástí každé čtvrtě. Je složeno z lalůček (lobulů) spojených intersticiálním vazivem a tyto lalůčky jsou tvořeny ještě menšími primárními lalůčky. Primárním lalůčkem prochází nitrolalůčkový (intralobulární) vývod, jímž začínají vývodné cesty vemene. Mléko je tvořeno sekrečními alveoly, které se pomocí sekrečních tubulů otevírají do již zmíněných nitrolalůčkových vývodů. Tyto vývody se po výstupu z primárních lalůček spojují v mezilalůčkové vývody, přecházející v mlékovod, který dále pokračuje do mléčné cisterny, zvané mlékojem (Marvan et al., 1992).

Mléčné alveoly jsou obklopeny myoepitelovými (košíčkovými) buňkami. Při kontrakci buněk vlivem oxytocinu dochází ke stlačení alveol a vývodů, jehož důsledkem je uvolňování mléka (ejekce mléka) (Reece, 1998).

Období tvorby mléka se nazývá laktace. Je to období od porodu do zaprahnutí, kdy díky blížícímu se porodu ustává sekrece mléka. Laktace zahrnuje proces sekrece, shromažďování a spouštění mléka (Jelínek et al., 2003).

Syntézu mléka a jeho vyloučení do alveolů uskutečňuje sekrece. Podle toho, kde se mléko shromažďuje, je rozlišováno mléko alveolární (v alveolech a počátečních oddílech vývodných cest) a mléko cisternové (mlékovody a mléčná cisterna). Právě délka intervalů mezi dojením určuje schopnost vemene mléko shromažďovat. Ejekci mléka, tedy jeho aktivní vypuzování z alveol, společně s pasivním uvolňováním cisternového mléka zahrnuje proces spouštění mléka (Jelínek et al., 2003).



Každá polovina vemene je krvena zevní stydkou tepnou, procházející tříselným kanálem. Zásobení krví jednotlivých čtvrtí dané poloviny obstarává kraniální a kaudální vemenná tepna. Sběr krve z kraniálních a kaudálních čtvrtí příslušné poloviny obstarává zevní stydká žíla, která vrací krev tříselným kanálem do zadní duté žíly (Reece, 1998).

Další významnou cévou, odvádějící krev kraniálním směrem, je mléčná žíla. Nachází se na ventrální straně těla bezprostředně pod kůží, kterou vyklenuje (Najbrt et al., 1982). Je široká s klikatým charakterem průběhu. Na úrovni chrupavky 8. žebra vstupuje do hrudní dutiny v místě tzv. ventrální mléčné studánky. Většina krve z vemene je u stojícího zvířete odváděna mléčnou žílou. U zvířete, které leží, je tato možnost omezená díky stlačení žíly pánevní končetinou a zabránění odtoku. V tomto případě krev odchází zevní stydkou žílou (Marvan et al., 1992).

## **2.2 Charakteristika obranného systému mléčné žlázy**

Díky genetickému výběru a technologickému pokroku je mléčná žláza skotu schopna produkovat o mnoho více mléka, než je potřeba k výživě novorozeného jedince (Sordillo a Streicher, 2002). U takto funkčně vytíženého orgánu dochází k velkému předpokladu narušení homeostázy, proto je u mléčné žlázy vyvinuta řada obranných mechanismů.

Z hlediska fylogenetického vývoje to jsou rezidentní obranné mechanismy a indukovaná obrana. Rezidentní obranné mechanismy obsahují nespecifické obranné prostředky kůže a sliznic a buněčnou ochranu uskutečňovanou neutrofilními granulocyty, makrofágy, lymfocyty, NK-buňkami, dendritickými a epitelovými buňkami. Mechanizmy rozpoznávání, aktivace, diapedeze a migrace buněk zánětu zahrnuje obrana indukovaná (Toman et al., 2009).

### **2.2.1 Obranná funkce kůže a sliznic**

Kůže tvoří bariéru mezi vnitřním a vnějším prostředím. Mikroby zachyceny v kůži a sliznici jsou odstraňovány neustálou deskvamací a obměnou epitelálních buněk (Hejlíček et al., 1987). Řada studií ukázala, že epitelální buňky jsou připraveny rychle reagovat na proniknutí bakterií prostřednictvím aktivace několika rozpoznávacích receptorů. Tyto procesy jsou velmi důležité, protože mohou vést k účinným antibakteriálním reakcím (Gilbert et al., 2013).

### **2.2.2 Drenáž mléčné žlázy**

Při odsávání mléka teletem či dojením dochází k obnovování a migraci rezidentních buněk. Tento proces napomáhá udržet mléčnou žlázu v pohotovosti vůči potenciální bakteriální noxe. Svůj význam má odsávání i v procesu vyplavování bakterií, které je uskutečňováno sekretem mléčné žlázy a posilováno sIgA na povrchu tukových kuliček. Z výše popsaných skutečností vyplývá, že riziko vzniku infekce se zvyšuje v období zaprahování, kdy není mléko pravidelně vydojováno (Toman et al., 2009).

### **2.2.3 Uzavíratelnost strukového kanálku**

Strukový kanálek začíná strukovou částí mlékojemu a končí vnějším otvorem. Okolo kanálku, ve stěně struku, se nachází svěrač z hladké svaloviny, který je normálně uzavřen. Rozbrázděná sliznice strukového kanálku, která vede od vnitřního vývodu a radiálně se rozbíhá, vytváří jeho růžici tzv. Fürstenbergovu rozetu. Ta je tvořena překrývajícími se řasami sliznice, které udržují mléko ve vemeni. Tlakem se záhyby zvedají a umožňují odtok mléka (Reece, 1998).

Strukový kanálek je první linií obrany, protože bakterie musí proniknout skrz, aby způsobily intramamární infekci. Funkcí strukového svěrače je udržet otvor uzavřený, a tím izolovat vnitřní prostředí mléčné žlázy. Z toho vyplývá, že jakékoli narušení těchto struktur zasahuje do homeostázy a způsobuje predispozici k zánětu (Oviedo-Boyso et al., 2007).

### **2.2.4 Keratin**

Keratin fyzicky blokuje strukový kanálek, a tím zabraňuje průniku bakterií (Paulrud, 2005). Vzniká odlupováním kožního epitelu a ochraňuje mléčnou žlázu nejen mechanicky, ale i chemicky (Rainard a Riollet, 2006). Je spojen s esterifikovanými a neesterifikovanými mastnými kyselinami, jako je kyselina myristová, palmitoolejová a linolová, které fungují jako bakteriostatika. Kromě toho se některé kationové proteiny spojené s keratinem mohou vázat na patogenní mikroorganismy, což zvyšuje jejich náchylnosti k osmolaritě (Oviedo-Boyso et al., 2007).

### **2.2.5 Laktoferin**

Jedná se o glykoprotein aktivně vázající ionty železa. Vzniká v neutrofilních granulocytech a epiteliálních buňkách. Schopností vázat volné železo inhibuje růst bakterií, pro které je železo růstovým faktorem. Koncentrace laktoferinu se zvyšuje při infekci. V případě zdravé mléčné žlázy je jeho koncentrace nízká. Podobně funkčním

proteinem je transferin, u kterého je ovšem schopnost vázat železo dvakrát nižší než u laktoferinu, kterému transferin může sloužit jako donor železitých iontů (Adlerová et al., 2008).

### **2.2.6 Laktoperoxidáza-thiokyanát-hydrogen-peroxidový systém**

Tento mechanismus je významný především v období laktace. V mléce je přítomen základní komponent, jímž je laktoperoxidáza. Obsah thiokyanátu závisí na režimu krmení, neboť v něm je tato látka obsažena. Třetím komponentem je peroxid vodíku, který je produktem některých bakterií, například streptokoků. Úroveň oxidace thiokyanátových iontů určuje aktivitu celého systému. Ten buď bakterie usmrcuje, nebo inhibuje jejich množení (Hejlíček et al., 1987).

### **2.2.7 Komplementový systém**

Tento systém hraje důležitou roli v přirozené imunitě proti mikroorganismům díky své baktericidní, opsonizační a zánětlivé funkci (Rainard, 2003). Představuje přibližně 30 rozpustných a membránových proteinů, které jsou v neaktivní formě obsaženy v plazmě a tělních tekutinách (Jelínek et al., 2003). Množství komplementu v mléce produkovaném zdravou mléčnou žlázou není vysoké. Kromě toho, ani klasická cesta aktivace není možná, vzhledem k nedostatku frakce C1q. Naproti tomu alternativní cesta je aktivní a vytváří množství C5a, která je u různých plemen variabilní (Rainard, 2003). Migrace neutrofilů je indukována fragmentem C5a a tento fragment je účinným stimulatorem fagocytární funkce neutrofilů (Toman et al., 2009).

### **2.2.8 Makrofágy**

Makrofágy představují dominantní typ buněk, který se vyskytuje v mléce a zdravé tkáni laktující mléčné žlázy. Slouží k usnadnění buď vrozené, nebo získané imunitní reakce. Jejich nescifickou funkcí je fagocytóza. Míra fagocytózy může být výrazně zvýšena opsonizací korpuskulárních antigenů. Množství makrofágů, které se nacházejí v mléčné žláze při zánětu, má tendenci být nižší, s menším počtem Fc receptorů. To v porovnání s neutrofily vede ke snížení rychlosti fagocytózy. Proto je schopnosti makrofágů sekretovat látky, které usnadňují migraci a baktericidní aktivity neutrofilů, přikládán větší význam než samotný proces fagocytózy (Sordillo a Streicher, 2002).

### **2.2.9 Neutrofilý (Polymorfonukleární leukocyty)**

Jedná se o nejvýznamnější činitele při akutních zánětech. Chemotaxí, diapedezí, fagocytózou a případnou mikrobicidní aktivitou zajišťují první linii obrany mléčné žlázy. Jakýkoli stav, který potlačuje funkci PMN, nepříznivě ovlivňuje odolnost mléčné žlázy k invazivním infekcím (Mehrzađ et al., 2010).

### **2.2.10 Lymfocyty**

Tento typ imunitních buněk rozpoznává pomocí membránových receptorů celou řadu antigenních struktur. Receptory definují jejich specifíčnost, rozmanitost a paměťové vlastnosti. Rozdělují se na T-lymfocyty, B-lymfocyty a NK-buňky (Ezzat Alnakip et al., 2014).

Mezi T-lymfocyty jsou zařazovány lymfocyty cytotoxické, pomocné a supresorové, (Jelínek et al., 2003) z nichž dominantními jsou cytotoxické CD8+ lymfocyty. Obstarávají odstranění starých a poškozených sekrečních buněk, jejichž přítomnost může vést k vyšší vnímavosti mléčné žlázy k zánětům. Bylo prokázáno, že stádium laktace výrazně ovlivňuje zastoupení subpopulací lymfocytů (Toman et al., 2009).

### **2.2.11 Imunoglobuliny**

Existují čtyři různé třídy imunoglobulinů (IgG1, IgG2, IgM, IgA), které hrají dominantní roli v obraně mléčné žlázy před patogeny. IgG1, IgG2 a IGM působí jako opsoniny a usnadňují fagocytózu PMN a makrofágů. Bakteriální kolonizaci, aglutinaci a neutralizaci bakteriálních toxinů zajišťuje IgA (Ezzat Alnakip et al., 2014).

## **2.3 Zánětlivá odpověď**

Zánětlivá odpověď (reakce) je nedílnou součástí vrozeného imunitního mechanismu, který se aktivuje v závislosti na skutečném, či vnímaném ohrožení homeostázy těla. Primárním cílem je neutralizovat infekční látky a iniciovat opravu poškozené tkáně (Maskrey et al., 2011).

Klinické projevy zánětu jsou na úrovni lokální (bolest, zarudnutí, otok, zteplání, porucha funkce) a celkové (zvýšená teplota těla, tachypnoe, tachykardie). Oba příznaky jsou doprovázeny buněčnou odpovědí v krevním obrazu, humorální odpovědí a změnou koncentrace reaktantů (Rozsypal et al., 2013).

Zánětlivá odpověď může mít hned několik příčin. Tyto příčiny se dělí na biologické (bakterie, viry, parazité), chemické, fyzikální (mechanické poranění, trauma), metabolické (poruchy) nebo imunologické (choroby) (Vokurka et al., 2012).

Dalším rozdělením příčin zánětu, které je podobné předchozímu, je na vlivy infekční a neinfekční. Mezi vlivy infekční patří primární původci zánětů mléčné žlázy a infekce jiných orgánů, především dělohy a končetin. Vlivy neinfekční zahrnují různá traumata mléčné žlázy, která jsou způsobena například špatným seřízením dojícího zařízení, mykotoxiny v krmivu, popřípadě stresem způsobeným teplotou (Zelinková, b.r.).

Z 90 % jsou záněty mléčné žlázy způsobeny bakteriální infekcí. Nejčastějšími gram pozitivními bakteriemi jsou streptokoky (*S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae*), stafylokoky (*S. aureus*), enterokoky (*A. pyogenes*, *C. bovis*). K zástupcům gram negativních bakterií patří například *E. coli* či *K. pneumoniae*. Se záněty gram negativními bakteriemi se imunitní systém krávy dokáže do několika dní vypořádat sám, proto není třeba nasazovat léčbu. Pravým opakem jsou záněty způsobené gram pozitivními zárodky, kde léčba nastat musí. Zbýlých 10 % je způsobeno záněty vzniklými různými traumaty (Bečvář, 2012; Ruegg, 2012).

Velkou pozornost zaujímají i případy, kdy při kultivaci v mléce nebyl prokázán klasický bakteriální původce. Mnohé důkazy svědčí o tom, že na vině jsou některé druhy mykoplazmat. Mykoplazmata jsou plně závislá na hostiteli. Je zřejmé, že jejich infekční charakter je zcela typický a k infekci mléčné žlázy dochází kontaktem (Smola a Haas, 2003).

Kvasinky jsou mikroorganismy, které jsou také často opomíjenou skupinou původců zánětu mléčné žlázy. Jedná se především o zástupce rodu *Candida*. Využívání širokospektrálních antibiotik, nebo různých kombinací antibiotik, vede ke zvýšení výskytu kvasinek, což je typické pro dlouhodobě neúspěšně léčené infekce (Smola a Haas, 2003).

Podle různých hledisek můžeme klasifikovat záněty na klinické či subklinické (Červinková et al., 2013). Změnou tělesné teploty, konzistencí samotné mléčné žlázy nebo sekrecí abnormálního mléka je charakterizována klinická mastitida. Zánět mléčné žlázy bez klinických příznaků je pak mastitida subklinická (Baumgartner, 2011).

Klinická mastitida může mít průběh perakutní, akutní, subakutní nebo chronický (Hofírek a Haas, 2003).

U akutních mastitid jsou na mléčné žláze pozorovány viditelné změny. Vzniká zarudnutí doprovázené bolestivým zduřením, zvětšením poškozené části a různě zřetelnými poruchami celkového stavu organismu. Dochází k makroskopické i mikroskopické změně mléka. Výsledným procesem nebo stavem akutní formy jsou mastitidy chronické, tedy vleklé. Dle délky trvání a charakteru zánětu, můžeme sledovat různé změny mléčné žlázy. Postižené místo je většinou zvětšené a dochází k atrofii (Hejlíček et al., 1987).

Průběh akutního zánětu má dvě stádia. Prvním je fáze iniciace, která je charakterizována masivním influxem neutrofilů z krve do místa zánětu (Paape et al., 2003) a jejich následným hromaděním v dutinovém systému mléčné žlázy. Tento obranný mechanismus využívá neutrofilní fagocytózy k odstranění patogenních organismů (Hurley, 1983). Druhým je fáze rezoluce, tedy odeznění. Ta nastává po ukončení fagocytózy neutrofilů a zahajuje fyziologickou, programovanou smrt buněk neboli apoptózu. Následně dochází k fagocytóze apoptických neutrofilů makrofágy (Sládek a Ryšánek, 2001). Smrt neutrofilních granulocytů může být i patologická, kdy se jedná o neprogramovanou buněčnou smrt, nekrózu. Buňky podléhající nekróze ztrácejí membránovou integritu a uvolňují své intracelulární komponenty, které stimulují zánětlivou reakci hostitele (Rock a Kono, 2008). Celý proces rezoluce vede k navrácení do stavu před vypuknutím infekce, tedy k obnovení poškozené tkáně a správné funkci mléčné žlázy (Hurley, 1983).

V obou těchto fázích hrají důležitou roli polymorfonukleární leukocyty, které jsou hlavním tématem této práce, a proto jim bude věnována následující kapitola.

## **2.4 Polymorfonukleární leukocyty (PMN)**

### **2.4.1 Vývoj**

Většina krevních buněk má krátkou životnost, proto musí být během života kontinuálně nahrazována. Proces vzniku krevních elementů je nazýván hematopoézou. Tyto elementy se během nitroděložního vývoje začínají tvořit ve žlutkovém váčku, játrech, slezině a kostní dřeni. Narozením se stává hlavním místem krvetvorby kostní dřeň (Moreira da Silva et al., 1994).

Výchozí kmenovou buňkou, která slouží pro formaci všech vývojových linií (erytrocytové, granulocytové, monocytové, megakaryocytové a lymfocytové) krevních elementů, je hemocytoblast. Diferenciací této buňky vznikají progenitorové kmenové

buňky, které jsou schopny další diferenciaci v prekurzorové kmenové buňky (Doubek et al., 2003).

Prekurzorovou kmenovou buňkou granulocytových řad, kam patří PMN, je myeloblast (Doubek et al., 2003). Myeloblastem začíná vlastní vývoj PMN, který je rozdělen do tří fází: fáze proliferace (množení), maturace (zrání) a fáze funkční (Moreira da Silva et al., 1994).

V první fázi mají buňky schopnost se mitoticky dělit (Moreira da Silva et al., 1994). Do této fáze spadají myeloblasty, následně větší promyelocyty a myelocyty (Paape et al., 2003). Již ve stádiu myeloblastů se začínají tvořit primární granule (Doubek et al., 2003). Myeloblast charakterizuje velké kulovité euchromatické jádro s třemi až pěti jadérky. Velikost buňky je 14–20  $\mu\text{m}$ . (Ross et al., 1989). K formování větších hustších azurofilních granul dochází ve stádiu promyelocytu. Jde o lysozomy s velikostí 0,3–0,8  $\mu\text{m}$ , obsahující substance s řadou antibakteriálních sloučenin, z nichž nejvýznamnější je myeloperoxidáza hydrogen peroxihalogenoid (Paape a Wergin, 1977). Velikost promyelocytu je srovnatelná s myeloblastem a jsou v něm přítomna jadérka (Ross et al., 1989). Během stádia myelocytu jsou formovány malé a husté sekundární granule, které tvoří čtyřnásobně větší podíl než granule primární (Sládek a Ryšánek, 2014). Velikost buňky se pohybuje od 16–24  $\mu\text{m}$  a jadérka chybí (Ross et al., 1989.)

Druhým stupněm vývoje je maturace neboli zrání. Jedná se o postmitotickou fázi, do které spadají metamyelocyty, které se diferencovaly z myelocytu (Moreira da Silva et al., 1994). V tomto stádiu lze jasně identifikovat PMN od eozinofilů a bazofilů, díky přítomnosti velkého množství granul. Velikost metamyelocytu je 12–18  $\mu\text{m}$  a jádro je ledvinovitého tvaru (Ross et al., 1989). Následně dochází k dozrání metamyelocytů v granulocyty s nesegmentovaným jádrem a později s jádrem segmentovaným. Po dokončení dělení začíná vyzrání. I tento proces se uskutečňuje v kostní dřeni. Trvá několik dnů a po tuto dobu tvoří tzv. zásobní hotovost. Dále vstupují do periferní krve, kde vytvářejí hotovost cirkulujících a marginujících (adherovaných) buněk (Doubek et al., 2003). Denní produkce PMN je  $1.10^{11}$  (Ross et al., 1989). Celý vývoj granulocytů je nazýván granulopoézou (Van Merris et al., 2002).

Poslední fáze, tj. fáze funkční, spočívá v zapojení vzniklých polymorfonukleárních leukocytů v boji proti infekcím (Moreira da Silva et al., 1994).

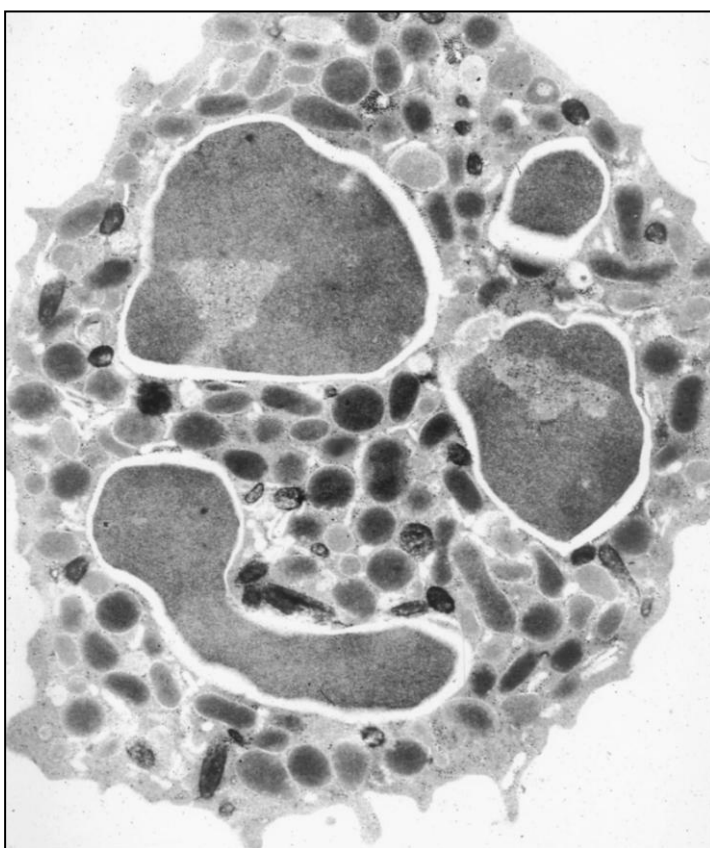
## 2.4.2 Struktura v periferní krvi

Polymorfonukleární leukocyty nacházející se v krvi jsou buňky o velikosti 9–10  $\mu\text{m}$ , jejichž tvar je eliptický, oválný či nepravidelný (Doubek et al., 2003).

V periferní krvi se tyto buňky nacházejí v různém stádiu vývoje, které lze posoudit dle tvaru jádra. Vývojově mladý, nesegmentovaný PMN, má jádro tyčovitého tvaru, chromatin je hrubý a shlukuje se. Vývojově starší, segmentovaný PMN, se vyznačuje členěným jádrem na úseky (segmenty), které jsou mezi sebou odděleny úzkými můstky. Chromatin je opět hrubý a řadí se do bloků (Doubek et al., 2003).

Významným strukturálním prvkem PMN je jejich multilobulární jádro, které je schopné zarovnání jaderných laloků do jedné roviny, což umožňuje rychlý přechod přes spoje endotelových buněk (Paape et al., 2003).

Jak již bylo uvedeno, PMN obsahují primární, sekundární a navíc i terciární granule (Prin-Mathieu et al., 2002). Terciární granule byly identifikovány u skotu, koz a ovcí. Tento třetí typ je zastoupen vyšším množstvím granulí než u předchozích typů, ale všechny obsahují stejné aktivní složky kromě laktoferinu. Granule jsou větší a hustší (Paape et al., 2003).



**Obr. č. 1** Ultrastruktura PMN v periferní krvi. Transmisní elektronová mikroskopie, zvětšení 22000 $\times$  (Paape et al., 2002)

Granula obsahují antibakteriální peptidy a enzymy, jako elastázu, kolagenázu, katepsiny, fosfatázy, lysozomy a jiné. Ty se podílejí na eliminaci bakterií a jsou schopny narušit extracelulární matrix (Prin-Mathieu et al., 2002).

Existuje homogenní populace PMN, které mají na svém povrchu velké množství pseudopodií (přibližně 95 %). Přítomnost těchto výběžků značně navyšuje plochu



cytoplazmatické membrány. Jelikož PMN postrádají schopnost tuto membránu obnovovat, je navýšení plochy zásadní pro fagocytózu, která cytoplazmatickou membránu využívá pro tvorbu fagozomů (Paape et al., 2003).

Životnost PMN je poměrně krátká. V krvi přežívají jen několik hodin (Doubek et al., 2003), proto musí vycestovat do tkání, kde plní své specifické funkce.

### **2.4.3 Migrace PMN z krevního řečiště do místa zánětu**

V širším slova smyslu představuje migrace PMN složitý proces složený z několika kroků, jako je chemotaxe, adheze, diapedeze a je zakončen digescí patogenů.

#### **2.4.3.1 Chemotaxe**

Proces chemotaxe je charakterizován cílenou migrací PMN do míst průniku bakterií nebo poškozené tkáně (Cicchetti et al., 2002). Vyžaduje časovou a prostorovou regulaci intracelulárních signálních drah. Ty umožňují PMN detekci atraktantového gradientu, polarizaci a rychlou migraci směrem k nejvyšší koncentraci chemoatraktantu (Nuzzi et al., 2007).

Chemotaxe kombinuje dva elementy. Buněčnou migraci a tzv. snímání gradientu. Migrace je proces mechanický. Polarizace aktinu předního okraje buňky poskytuje sílu potřebnou k posunu buňky směrem vpřed, z čehož vyplývá, že směrovým prvkem je zmíněná polarizace a schopnost rozeznat mělký, extracelulární gradient chemoatraktantu. PMN jsou schopné vysoké rychlosti migrace ve srovnání s ostatními typy buněk. Tato rychlost je na úkor stability adheze na substrát, kde adherentní buňky (např. fibroblasty) vykazují vyšší stabilitu. PMN také netvoří strukturované fokální kontakty, jak je tomu pozorováno u jiných typů buněk schopných adheze (Gambardella a Vermeren, 2013).

Důležitou roli v procesu chemotaxe hrají makrofágy. Po fagocytóze bakterií jsou makrofágy schopny vylučovat faktory, které jsou chemotaktické pro PMN. Není známo, zda tyto faktory mohou procházet celistvým (nedotčeným) epitelem nebo je průstup podmíněn narušením epitelové bariéry. Předpokládá se, že makrofágy mohou řídit aktivaci epiteliálních buněk za podmínek, kdy tyto buňky vykazují na svém apikálním pólu receptory pro jejich mediátory. Makrofágy mají schopnost vylučovat celou řadu zánětlivých mediátorů, cytokinů nebo komponentů odvozených od kyseliny arachidonové, což z nich činí významné buňky v procesu obrany mléčné žlázy (Rainard a Riollot, 2003).

Mezi další chemoatraktanty, které zahrnují bakteriální produkty, patří například formylované peptidy, C5a (produkt kaskády komplementu), produkty metabolismu fosfolipidů (leukotrien B4) (Cicchetti et al., 2002), interleukiny-1 (IL-1), IL-2 a IL-8 (Paape et al., 2002).

Chemotakticky působí i degenerativní produkty poškozené tkáně a produkty patogenů. Dochází ke zvýšení permeability epitelu cév a tím se ulehčuje prostup pro neutrofilní granulocyty (Reece, 1998).

K aktivaci PMN dochází po vazbě chemoatraktantů. Následuje adheze na stěnu kapilár, prostup cévní stěnou a migrace do poškozené tkáně (Toman et al., 2009).

Chemotaxe zahajuje i proces fagocytózy, která zprostředkovává pohlcení a zpracování cizorodého materiálu, jako jsou např. nefunkční mrtvé buňky a jiný korpuskulární materiál (Toman et al., 2009).

#### **2.4.3.2 Adheze**

Důležitým krokem v migraci PMN do místa zánětu je adheze na endoteliální buňky výstelky cév. Klíčovou roli v tomto procesu hrají adhezní molekuly, jako jsou selektiny,  $\beta$ 2-integriny a kadheriny (Diez-Fraile et al., 2002; Mena et al., 2013).

Selektiny jsou adheziny s lektinovou doménou, rozpoznávající cukerné složky. Na buněčných membránách se objevují jako první a zajišťují vazbu k endotelu zastavením cirkulujících leukocytů (Toman et al., 2009).

Skupina selektinů se skládá ze tří typů proteinů, které určují jejich předpony. E-selektin (CD62E), jenž je exprimován endoteliálními buňkami, P-selektin (CD62P) trombocyty i endoteliálními buňkami a L-selektin (CD62L) leukocyty (Carlos a Harlan, 1994).

Nástup aktivace jednotlivých typů je různý. Nejrychlejším, který je uvolňován do několika minut, je P-selektin. Přibližně do 3 hodin se aktivuje E-selektin, umožňující valivý pohyb PMN. Poslední, L-selektin, umožňuje vazbu k endotelu (Toman et al., 2009).

Při fyziologických podmínkách je pohyb PMN veden v lumen cévy, uprostřed krevního proudu. Při zachycení chemotaktických (prozáněťových) stimulů dochází k vychýlení PMN ze středu lumen cévy směrem k endotelu cév (Ferenčík et al., 2005). První kontakt mezi PMN a endoteliálními buňkami postkapilárních venul je známý jako tethering a je zprostředkován zmíněnými selektiny a jejich counter-receptory (Zarbock a Ley, 2008). Následuje tzv. rolling pohyb (kutálení) po endotelových buňkách.

Na povrchu PMN se objevují další typy adhezních molekul – integriny (Ferenčík et al., 2005).

Mezi  $\beta_2$ -integriny patří LFA-1 (CD11a / CD18), Mac-1 (CD11b / CD18) a p150,95 (CD11c / CD18) (Nagahata, 2004). Zatímco skupina selektinů je tvořena monomery,  $\beta_2$ -integriny jsou tvořeny heterodimerními a,b komplexy, jejichž exprese je omezena na leukocyty (Diez-Fraile et al., 2002).

Dojde-li v prostředí k rozpoznání prozánětlivých cytokinů (IL-8, TNF nebo IL-1), nastupuje jedna z klíčových funkcí  $\beta_2$ -integrinů, což je rychlý přechod z ne-adhezivního nízko afinitního stavu k vysoce adhezivnímu stavu s vysokou afinitou. Tato úprava umožňuje pevnou přilnavost k ligandům na buňkách vaskulárního endotelu, tj. k intracelulární adhezní molekule a vaskulární celulórní adhezní molekule (ICAM-1, VCAM-1). Tyto molekuly mezibuněčné adheze patří do proteinové superrodiny imunoglobulinů (Diez-Fraile et al., 2002; Bartůňková et al., 2007). Uvedený typ přilnutí je pevnější než selektinová adheze a výsledkem je již výše zmíněný valivý pohyb PMN po endotelových buňkách (Ferenčík et al., 2005).

Následně, prostřednictvím molekul ICAM a VCAM, dochází ke spuštění komplexního děje, díky němuž dojde k rozšíření pórů mezi endotelovými buňkami a protažení PMN (Bartůňková et al., 2007).

Syntéza L-selektinu a  $\beta_2$ -integrinů byla popsána již v průběhu zrání PMN v kostní dřeni a dosahuje svého maxima při ukončení proliferace. Po uvolnění PMN z kostní dřene a po jejich aktivaci, exprese L-selektinu prudce klesá dle proteolytické aktivity na buněčné membráně (Diez-Fraile et al., 2002).

#### **2.4.3.3 Diapedeze**

V reakci na chemotaktické stimuly PMN migrují z krve přes endotel, subepiteliální matrix, bazální membránu a epitel mléčné žlázy do místa zánětu (Smits et al., 1999).

PMN obsahují proteázy, které jsou schopny štěpit kolagen, laminin a další extracelulární složky přítomné v cévní stěně, přes  $\beta_1$ -integriny. Důvody pro uvolnění proteáz a digesci složek extracelulární matrix při adhezi a migraci nejsou zcela jasné (Wagner a Roth, 2000).

Přestože mechanismus extravazace není zcela pochopen, je zřejmé, že v tomto procesu dochází ke snížení funkce selektinů a důležitou molekulou pro skutečný prostup je adhezní molekula, strukturně podobná imunoglobulinům, PECAM-1 (CD31). Nachází se na PMN, krevních destičkách a endotelových buňkách. V důsledku místa

spoje se předpokládá, že PECAM-1 je naváděcí receptor pro vyhledávání transendoteliálního portálu pro migrující PMN (Wagner a Roth, 2000). K vycestování z krevního řečiště je nutná reakce, která umožní změnu tvaru PMN, kdy dojde k seřazení laloků multilobulárního jádra do jedné roviny, což umožní rychlejší průstup endotelem (Mehrzađ et al., 2010). Aby k této reakci došlo, musí dojít k expresi molekul ICAM-1 a VCAM-1 na endotelu, se kterými reagují LFA-1 (CD11a /CD18) a VLA-4 nacházející se na povrchu PMN (Toman et al., 2009).

Samotné mechanismy transendoteliální migrace nejsou zcela známé. K akademickým sporům dochází i v základní premise, zda PMN migrují mezi endoteliálními buňkami (paracelulární dráhy) nebo přímo přes buňky endotelu (transcelulární dráhy, transcytóza) (Kvietys a Sandig, 2001).

Převažující konsensus tvrdí, že cirkulující PMN k migraci z intravaskulárního prostoru do intersticia využívají paracelulární dráhy. Vědci vycházejí ze studie těchto migračních tras, kdy 90 % pozorovaných PMN přednostně využívalo paracelulární dráhy oproti transcelulárním drahám (Kroon et al., 2014). Aby bylo možné použít paracelulární dráhy, musí být adhezni spojení mezi sousedícími endoteliálními buňkami narušeno a musí nastat jejich dostatečné oddělení pro průchod PMN, které je zajišťováno PMN uvolňovanou elastázou. Elastáza není vylučována přímo do extracelulárního prostředí, spíše dochází k její mobilizaci na membránu a lokalizaci na migrující stranu, např. pronikajícími pseudopodiemi (Kvietys a Sandig, 2001).

Navzdory všeobecnému přesvědčení, že PMN využívají spíše paracelulární migraci, jsou i důkazy o tom, že migrace může probíhat i transcelulární cestou. Zde zůstává nejasné, proč PMN prostupují přes endoteliální buňky, než aby využily přerušení buněčných spojů (Muller, 2011).

Zda migrace PMN probíhá paracelulární nebo transcelulární cestou, může záviset na relativní těsnosti endoteliálních spojů a schopnosti PMN k jejich porušení. Byly vysloveny spekulace, že PMN pronikají cestou nejmenšího odporu. Pokud jsou spoje velmi těsné, je jednodušší migrace přes buňky v tenkém místě. Nicméně tento poznatek nemůže být jediným vysvětlením, protože postkapilární venuly, což jsou místa, která slouží k migraci, mají velmi mnoho netěsných spojů (Muller, 2011).

Diapedeza rovněž spotřebovává energetické rezervy z PMN, které jsou potřebné pro efektivní fagocytózu a usmrcení patogenů. Po extravazaci PMN pomocí améboidního pohybu migrují do místa infekce přes parenchym mléčné žlázy až do mléka. Nedostatek

snadno dostupných zdrojů energie v mléce zhoršuje jejich fagocytární účinnost. Snížená účinnost PMN v mléce je také přisuzována požitím globulí mléčného tuku a kaseinových micel. Z tohoto důvodu je k zabránění infekce potřebný velký počet PMN. Nicméně počet PMN ve zdravé mléčné žláze je nízký (Smits et al., 1999; Lou et al., 2007).

#### **2.4.3.4 Fagocytóza**

Při migraci z cévního systému do lumenu alveol se PMN setkávají hned s několika strukturálními překážkami. Při této migraci dochází po celé alveolární epiteliální výstelce k velkému poškození. To je jak mechanické (vzhledem k průchodu velkého množství těchto buněk), tak i chemické (dochází k poškození sekrečních buněk, stejně jako duktálního epitelu) (Akers a Nickerson, 2011).

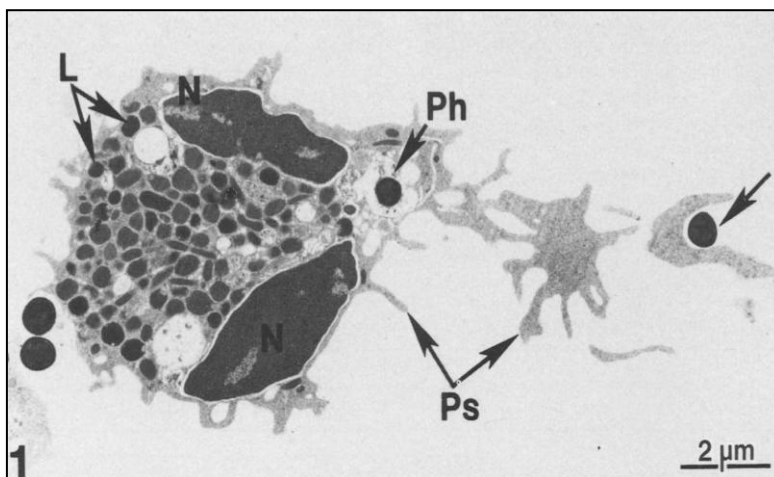
Aby se minimalizovalo poškození mléčné žlázy způsobené bakteriálními toxiny, k eliminaci invazivních bakterií musí dojít rychle (Paape et al., 2002). Proces, který tuto ochranu zajišťuje, se označuje jako fagocytóza (Voyich et al., 2003). Patogeny jsou nejprve pohlceny plazmatickou membránou do vakuoly, která se nazývá fagozom (Lee et al., 2003), a následně zničeny oxidačním vzplanutím a mikrobiálními produkty obsaženými v granulích PMN (Voyich et al., 2003). Fagocytóza je usnadňována opsonizací, která ulehčuje rozpoznávání cílového objektu, a tím zrychluje celý děj. Děje se tak prostřednictvím opsoninů, z nichž jsou nejdůležitější imunoglobuliny (IgG, IgM) a složky komplementového systému C3 (C3b, C3bi), vytvořené na povrchu bakterií. Celý systém by nemohl fungovat bez receptorů pro tyto části, především FcR a C3R, které jsou na povrchu PMN (Paape et al., 2002; Barrio et al., 2003).

Zatímco pohlcení částice je v obou případech konečný výsledek, procesy související s internalizací nejsou totožné. V případě komplementem opsonizovaných částic dochází k jemnému zanoření do buňky, kdežto Fc receptor iniciuje intenzivní prodloužení pseudopodií, které obklopují, a nakonec zachycují částice. Podobně jako makrofágy, mohou PMN internalizovat jak opsonizované, tak neopsonizované částice. (Lee et al., 2003). PMN jsou extrémně efektivní fagocyty, kde internalizace IgG opsonizovaných bakterií může trvat i méně než 20 vteřin (Nordenfelt a Tapper, 2011).

Následně vzniklý fagozom nemá schopnost usmrctvat patogeny a degradovat pohlcené částice. Tyto vlastnosti jsou získány až v průběhu zrání fagozomu. To zahrnuje komplexní sled reakcí, které vedou k „drastickým“ remodelacím fagozomální membrány a obsahu. Na konci procesu dochází ke vzniku hybridní

organely, fagolizozomu, (Vieira et al., 2002) splynutím fagozomu a lyzozomů, které jsou v barvených buňkách patrné jako granula (Jílek, 2014). Trávení ve fagolizozomu probíhá díky řadě doplňkových degradačních vlastností (Franc et al., 1999) K nim patří nízké pH, hydrolytické enzymy, defensiny a jiné baktericidní peptidy se schopností vytvářet oxidační sloučeniny (Vieira et al., 2002). Za nejúčinnější typ jsou považována azurofilní granula, díky vysokému obsahu antimikrobiálních látek a možnosti dosahovat vysokých koncentrací ve fagozomech (Nordenfelt a Tapper, 2011).

Usmrcení bakterií probíhá pomocí dvou mechanismů, kyslíku závislých a nezávislých (Van Oostveldt et al., 2002). K faktorům, které jsou na kyslíku nezávislé, patří mnoho látek s různými



mechanismy účinku, jako je například enzym lysozym, který napomáhá rozkladem buněčných stěn gram pozitivních bakterií, nebo laktoferin (Jílek, 2014).

**Obr. č. 2** PMN v procesu pohlcení *Staphylococcus aureus* (označen šipkou). Kok je pozorován ve fagozomu (Ph), do kterého jsou uvolňovány trávicí enzymy z lyzozomů (L) a celek tvoří fagolizozom. PMN na povrchu vykazuje četné pseudopodia (PS), polymorfní jádro (N) a značné množství lyzozomů v cytoplasmě. Transmisní elektronová mikroskopie, zvětšení 7800× (Nickerson et al., 1986)

Během fagocytózy se zvyšuje spotřeba nemitochondriálního kyslíku, dochází k tzv. respiračnímu (oxidativnímu) vzplanutí s tvorbou různých reaktivních kyslíkatých sloučenin (ROS) (Van Oostveldt et al., 2002), které buňka tvoří až po aktivaci pohlceným materiálem (Jílek, 2014). Mezi ROS patří superoxid a peroxid vodíku. Ty se tvoří na buněčném povrchu, fagozomální membráně a interagují za vzniku hydroxylových radikálů a jednoduchého kyslíku (Paape et al., 2002). To jsou sloučeniny s výraznými oxidačními účinky, které poškozují životně důležité pochody bakterií. Dalším mikrobicidním faktorem je přeměna aminokyselin na chloramidy, kterou způsobují metabolity kyslíku v přítomnosti enzymu myeloperoxidázy a chloridových iontů (Jílek, 2014). Tento systém usmrcování, který je na kyslíku závislý, patří k efektivní obraně proti gramnegativním bakteriím (Paape et al., 2002).

Účinné oxidanty neničí jen bakterie, ale i některé epiteliální buňky lemující kanálky a alveoly mléčné žlázy. Tím způsobují poškození jemné výstelky alveolů mléčné žlázy, které má za následek trvalé „zjizvení“ a snížení počtu sekrečních buněk (Paape et al., 2000).

Na konci celého procesu fagocytózy PMN procházejí procesem programované buněčné smrti, známým jako apoptóza. Následně dojde k pohlcení apoptických PMN makrofágy, čímž se minimalizuje uvolňování obsahu neutrofilních granulí, které poškozují tkáň (Paape et al., 2003). Nástup apoptózy je limitován množstvím energie, kterou má PMN k dispozici. Jestliže je množství energie nedostatečné, nastupuje druhá možnost buněčné smrti, nekróza (Van Oostveldt et al., 2002).

#### **2.4.3.5 Apoptóza**

Jakmile dojde k odstranění patogenních mikroorganismů fagocytózou, přechází akutní zánět z fáze iniciace do fáze rezoluce čili odeznění (Hurley, 1983).

Rezoluce zánětu je aktivní a dynamický proces, který vede k obnovení homeostázy a je charakterizován několika odlišnými fázemi. Za prvé, ukončuje se produkce prozánětlivých cytokinů a dochází k zastavení influxu zánětlivých PMN. Za druhé, PMN přítomné v místě zánětu podstupují apoptózu a za třetí, makrofágy provedou „fenotypový přesmyk“ a zahájí eferocytózu apoptických buněk (Croasdell et al., 2015).

Jestliže nedojde k eliminaci PMN z místa zánětu, přechází akutní zánět do chronického stavu, který může trvat týdny, měsíce, nebo dokonce roky (Dunster et al., 2014). Proto je odstranění PMN z místa zánětu nezbytným krokem k rychlé reparaci poškozené tkáně. Jediným možným mechanismem rychlého a bezpečného odstranění buněk je apoptóza (Savill, 1997).

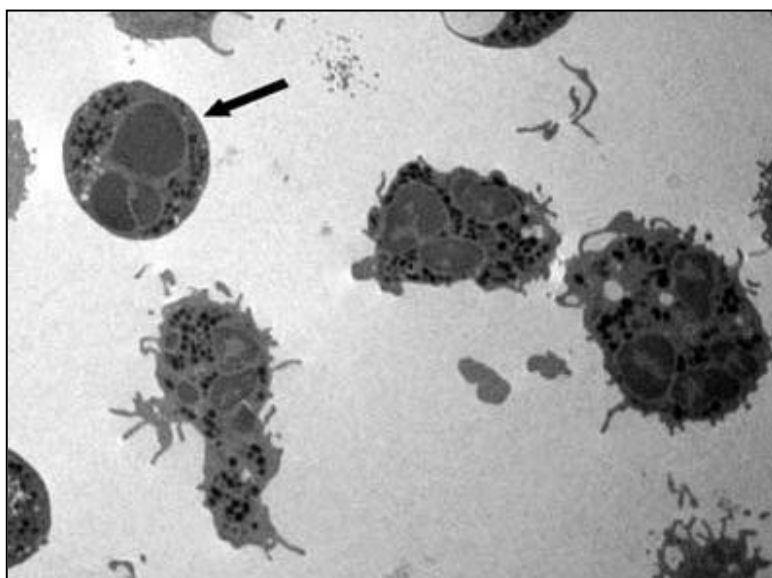
Apoptóza je významný biologický a geneticky determinovaný proces (Cummings et al., 1997), který hraje důležitou roli v průběhu vývoje. Slouží k odstranění nadbytečných buněk a tkání, například při tvarování orgánů v průběhu metamorfózy, nadpočetných buněk během vývoje nervového systému a srdeční morfogeneze (Suzanne a Steller; 2013).

PMN podstupují spontánní apoptózu v nepřítomnosti cytokinů nebo jiných prozánětlivých agens ještě před jejich pohlcením makrofágy. Fagocytóza neporušených, apoptických PMN, zabraňuje uvolnění jejich cytotoxického obsahu do extracelulárního prostředí, které by nastalo v případě, že buňky zanikly nekrózou (Akgul et al., 2001).

Mechanismy apoptózy jsou velmi složité a sofistikované, zahrnující energeticky závislou kaskádu molekulárních dějů, při kterých nastávají různé morfologické změny. Buňky jsou smršťovány, dochází ke kondenzaci chromatinu jádra a cytoplazmy, zpěnění cytoplazmatické membrány a oddělení buněčných fragmentů do apoptických tělísek (Elmore, 2007).

Morfologické změny probíhají ve třech fázích. V první fázi (karyopyknosis) dochází ke kondenzaci chromatinu do prstenčitých nebo do půlměsíčitých čepiček na jaderném obvodu, nukleární desintegraci a snížení velikosti jádra. Také je pozorováno smršťování buněk, zvýšení jejich hustoty a dilatace endoplazmatického retikula. Ve druhé fázi (zeiosis), která se může překrývat s první fází, nastává zpěnění cytoplazmatické membrány a oddělení fragmentů jader a cytoplazmy do několika malých membránově vázaných apoptických tělísek, jež jsou součástí třetí fáze. Ve třetí fázi nastává progresivní degenerace reziduálních jaderných a cytoplasmatických struktur (Arends et al., 1990). Apoptická tělíska neuvolňují své složky do okolní tkáně a jsou rychle fagocytována makrofágy, což brání jejich sekundární nekróze (Elmore,

2007). Proces eliminace apoptických neutrofilů makrofágy je známý jako eferocytóza. Ta je významná nejen skrze odstranění zanikajících PMN dříve, než by došlo k poškození tkáně, ale také působí jako silný protizánětlivý stimul pro další buňky zapojené do průběhu zánětu (Martin et al.,



**Obr. č. 3** Apoptický PMN ve stádiu karyopyknosis (označen šipkou). Transmisní elektronová mikroskopie, zvětšení 5000× (Sládek et al., 2005) (Sládek et al., 2015). Jak z výše uvedeného textu plyne, je apoptóza PMN a eferocytóza nezbytným krokem k uskutečnění rezoluce akutního zánětu mléčné žlázy.

Apoptóza může být oddálená, indukovaná nebo ovlivňována mikroorganismy v závislosti na jejich imunitní strategii úniku a zdraví hostitele, se kterým se setkávají



(Fox et al., 2010) a inhibována působením buněk specifických hormonů, růstových faktorů a mitogenů (Haanen a Vermes, 1995).

#### **2.4.3.6 Nekróza**

Alternativou apoptické smrti buněk je nekróza, která je charakterizována jako pasivní, nekontrolovaná a náhodná forma buněčné smrti (Fink a Cookson, 2005). Jako taková postrádá základní signalizační děje (Alvarez et al., 2010). Jedná se o buněčnou smrt turbulentní a následkem neočekávaných událostí dochází k neregulovatelnému uvolňování toxických složek, včetně proteolytických a oxidačních enzymů (Iba et al., 2013). Nekróza ovlivňuje tkáň nebo okolní buňky a vyvolává zánětlivou odpověď v reakci na uvolněný buněčný obsah (Haanen a Vermes, 1995).

Nekróza buňky je zprostředkována dvěma hlavními mechanismy. Přímým poškozením buněčných membrán, nebo zásahem do energie, která je pro buňku k dispozici (Elmore, 2007). Jak už bylo výše nastíněno, energie je určujícím faktorem, zda buňka zanikne apoptózou nebo nekrozou, přičemž nekróza nastane v důsledku jejího vyčerpání (Alvarez et al., 2010).

Základním rysem, který odlišuje většinu forem nekrózy před apoptózou, je rychlá ztráta buněčných membránových potenciálů. Neschopnost udržovat tyto elektrochemické potenciály má za následek bobtnání cytoplazmy, protržení plazmatické membrány a cytolýzu. Tato ztráta membránových potenciálů může být důsledkem vyčerpání buněčné energie, poškození membránových lipidů nebo porušení homeostázy (Zong a Thompson, 2006).

Morfologické změny, ke kterým v procesu nekrózy dochází, mohou probíhat ve třech na sebe navazujících stádiích.

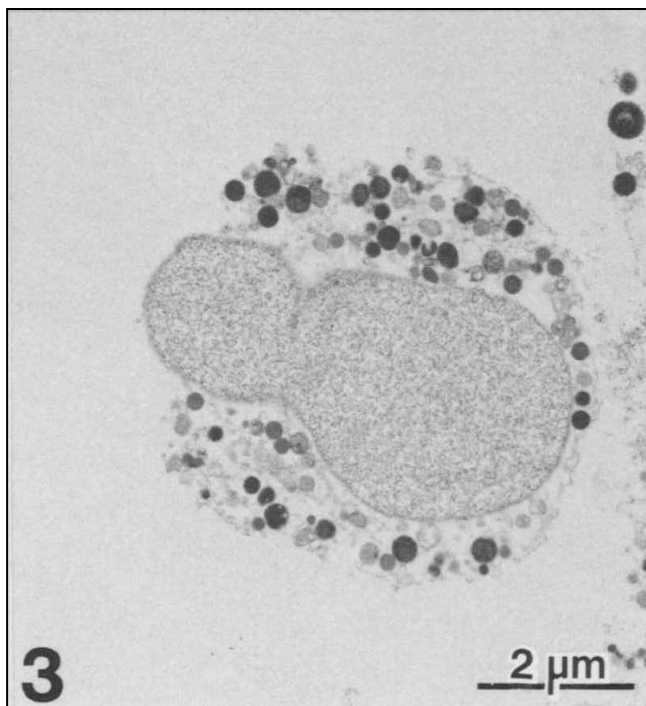
Prvním je fáze reverzibilních změn, která se vyznačuje bobtnáním buňky, jádra a cytoplazmy, doprovázené kondenzací chromatinu (Van Cruchten a Van Den Broeck, 2002). U PMN dochází ke ztrátě pseudopodií, což vede k poruchám fagocytózy (Paape et al., 1991).

Ve druhé fázi již ireverzibilních změn neustává bobtnání organel, jako jsou např. mitochondrie a následuje jejich prasknutí. Pokračuje bobtnání cytoplazmy, buňka se neúměrně zvětšuje (Nikoletopoulou et al., 2013). Nastává pyknóza jádra, ztráta kondenzace chromatinu a následně jejich rozpad na fragmenty (Arends a Wyllie, 1991).

Třetím stádiem je lýza buňky. V této fázi je pozorována ztráta barvitelnosti jádra a jeho vylití do cytoplazmy nebo mimo buňku (Haanen a Vermes, 1995). Dochází také

k cytolýze, tedy ruptuře cytoplazmatické membrány, a následnému vylití obsahu do extracelulárního prostoru (Haanen a Vermes, 1995; Nikolettou et al., 2013).

V mléčné žláze skotu vědci pozorovali některé formy nekrózy PMN, které se od sebe odlišují specifickými morfologickými rysy. Díky nim lze proces nekrózy PMN rozčlenit na tři typy: alterované, edématózní a lyzované PMN. Alterované PMN jsou kulaté, mají méně pseudopodií. Segmenty jádra se mírně zvětšují a tvar cytoplazmatických granulí je kulatý. Edématózní PMN vykazují bobtnání cytoplazmy a ve většině případů i úplnou ztrátu pseudopodií. U lyzovaných PMN lze pozorovat degeneraci



**Obr. č. 4** Lyzovaný PMN vykazující silně nabobtnalé jádro a degeneraci cytoplazmatické membrány. Transmisní elektronová mikroskopie, zvětšení 8100× (Nickerson et al., 1986)

cytoplazmy, částečnou ztrátu plazmatické membrány s následným vylitím chromatinu do cytoplazmy a buněčného okolí (Nickerson et al., 1986).

Může dojít k situaci, kdy apoptické PMN nemusejí být rozpoznány makrofágy. V takovém případě podstupují sekundární nekrózu. Tento jev se zdá být zvláštní, protože apoptóza a nekróza jsou často považovány za dvě protilehlé formy buněčné smrti. Nicméně, dle některých vědců, nekróza není forma buněčné smrti, ale konečné stádium každého procesu buněčné smrti (Van Cruchten a Van Den Broeck, 2002).

### 3 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo prostudovat a zpracovat literaturu do podoby rešerše, která sumarizuje poznatky o průběhu zánětlivé reakce a funkci, kterou PMN v průběhu akutního zánětu hrají.

Zánět, který se řadí k jednomu z nejstarších obranných mechanismů, je odpovědí organismu na poškození tkáně. Nastává z mnoha důvodů, ať už jsou biologické, chemické, fyziologické, metabolické nebo imunologické a mezi jeho projevy patří bolest, otok, zarudnutí, zvýšená teplota.

Zánětlivou odpovědí dochází k rychlé reakci imunitních buněk na porušení integrity vnitřního prostředí. V případě mléčné žlázy, která je velmi exploatovaným orgánem, je narušení homeostázy snadné, neboť vytižené orgány jsou ve vyšší míře náchylnější k fyzickému poranění, poruchám funkce a onemocnění. Proto došlo během evoluce k vytvoření obranných mechanismů, jako je akutní zánětlivá odpověď zprostředkovaná buňkami obranného systému mléčné žlázy. Ta se rozděluje na dvě stádia: stádium iniciace a rezoluce.

V prvním stádiu migrují leukocyty do poškozené tkáně a akumulují se v mléčné žláze. V této fázi jsou nejvýznamnějšími buňkami PMN a během tohoto procesu představují hlavní buněčnou populaci. Vznikají granulopézou, vyvíjí se a zrají v buňky se segmentovaným jádrem. Na základě chemotaktických signálů migrují z krevního řečiště, přičemž cílem je místo s nejvyšší koncentrací chemoatraktantu. Díky adhezním molekulám, jako jsou selektiny a  $\beta 2$ -integriny, PMN adherují na stěnu kapilár, diapedezí přes ni prostupují a pomocí améboidního pohybu cestují tkání do místa zánětu. K eliminaci bakteriálních toxinů musí dojít rychle, aby se minimalizovalo případné poškození tkáně. Tuto ochranu zajišťuje primární funkce PMN – fagocytóza. Patogeny jsou pohlceny do fagozomu a zničeny mikrobiálními produkty granulí PMN a oxidačním vzplanutím. Tímto krokem končí fáze iniciace a akutní zánět přechází do fáze rezoluce.

Rezoluce vede k obnovení homeostázy. Zastavuje se influx PMN a ty, co jsou přítomné v místě zánětu, podstupují apoptózu, programovanou fyziologickou buněčnou smrt, s následnou fagocytózou makrofágy. Během apoptózy nedochází k úniku toxického obsahu do extracelulárního prostoru, což z ní dělá šetrný způsob eliminace apoptických PMN. To se nedá říct o nekróze, která je patologickým typem buněčné smrti. Nekróza nastává v důsledku přímého poškození buněčných membrán nebo

vyčerpáním energie. Z tohoto důvodu je apoptóza a následná eferocytóza jediným možným způsobem bezpečného odstranění PMN z mléčné žlázy a důležitým krokem k uskutečnění rezoluce akutního zánětu. Pokud by k odstranění PMN z místa zánětu nedošlo, přechází akutní zánět do chronického stavu, který může trvat podstatně delší dobu. V tomto případě je prodloužena doba, kdy nelze považovat mléčný sekret za nezávadný, a proto jej nelze uplatňovat na trhu, což je spojeno s ekonomickými ztrátami.

#### 4 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ADLEROVÁ L., BARTOŠKOVÁ A., FALDYNA M., 2008: Lactoferrin: a review. *Veterinarni Medicina*. 53 (9), 457-468. ISSN 0375-8427.
2. AKERS R. M., NICKERSON S. C., 2011: Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 16 (4), 275-89. DOI: 10.1007/s10911-011-9231-3.
3. AKGUL C., MOULDING D. A., EDWARDS S. W., 2001: Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS letters*. 487 (3), 318-22. ISSN 0014-5793.
4. ALVAREZ A., LACALLE J., CAÑAVATE M. L., ALONSO-ALCONADA D., LARA-CELADOR I., ALVAREZ F. J., HILARIO E., 2010: Cell death. A comprehensive approximation. Necrosis. *Microscopy: Science, Technology, Application and Education*. 3, 1017-1024.
5. ARENDS M. J., MORRIS R. G., WYLLIE A. H., 1990: Apoptosis. The role of the endonuclease. *The American journal of pathology*. 136 (3), 593-608. ISSN 0002-9440.
6. ARENDS M. J., WYLLIE A. H., 1991: Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *International review of experimental pathology*. 32, 223-254. ISSN 0074-7718.
7. BARRIO M. B., RAINARD P., POUTREL B., 2003: Milk complement and the opsonophagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* mastitis isolates by bovine neutrophils. *Microbial pathogenesis*. 34 (1), 1-9. DOI: 10.1016/S0882-4010(02)00186-9.
8. BARTŮŇKOVÁ J., ŠEDIVÁ A., JANDA A., 2007: *Imunodeficiency*. 2., přepřac. a dopl. vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 254 s. ISBN 978-80-247-1980-1.

9. BAUMGARTNER M., 2011: Patogeneze, epizootologické aspekty a strategie profylaxe klinické a subklinické mastitidy. In Mastitidy skotu. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2011, 8 - 10.
10. BEČVÁŘ O., 2012: Mastitida může být příběh s koncem. Zemědělec [online]. [cit. 2015-12-05]. Dostupné z:  
<[http://www.vvs.cz/system/uploaded\\_files/110/original/zm11\\_strana32.pdf?1383214682](http://www.vvs.cz/system/uploaded_files/110/original/zm11_strana32.pdf?1383214682)>
11. CARLOS T. M., HARLAN J. M., 1994: Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*. 84 (7), 2068-101. ISSN 0006-4971.
12. CICCHETTI G., ALLEN P. G., GLOGAUER M., 2002: Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 13 (3), 220-8. ISSN 1045-4411.
13. CROASDELL A., DUFFNEY P. F., KIM N., LACY S. H., SIME P. J., PHIPPS R. P., 2015: PPAR $\gamma$  and the innate immune system mediate the resolution of inflammation. *PPAR research*. 1-20. ISSN 1687-4757.
14. CUMMING M. C., WINTERFORD C. M., WALKER N. I., 1997: Apoptosis. *The American journal of surgical pathology*. 21 (1), 88-101. ISSN 0147-5185.
15. ČERVINKOVÁ D., VLKOVÁ H., BORODACOVÁ I., MAKOVCOVÁ J., BABÁK V., LORENCOVÁ A., JAGLIC Z., 2013: Prevalence of mastitis pathogens in milk from clinically healthy cows. *Veterinarni Medicina*. 58(11), 567-575. ISSN 0375-8427.
16. DIEZ-FRAILE A., MEYER E., BURVENICH C., 2002: Regulation of adhesion molecules on circulating neutrophils during coliform mastitis and their possible immunomodulation with drugs. *Veterinary immunology and immunopathology*. 86 (1-2), 1-10. ISSN 0165-2427.

17. DOUBEK J. et al., 2003: *Veterinární hematologie*. Brno: Noviko, 464 s. ISBN 80-86542-02-5.
18. DUNSTER J. L., BYRNE H. M., KING J. R., 2014: The resolution of inflammation: a mathematical model of neutrophil and macrophage interactions. *Bulletin of mathematical biology*. 76 (8), 1953-80. DOI 10.1007/s11538-014-9987-x.
19. ELMORE S., 2007: Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 35 (4), 495-516. ISSN 0192-6233.
20. EZZAT ALNAKIP M., QUINTELA-BALUJA M., BÖHME K., FERNÁNDEZ-NO I., CAAMAÑO-ANTELO S., CALO-MATA P., BARROS-VELÁZQUEZ J., 2014: The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions. *Journal of veterinary medicine*. 1-31. DOI 10.1155/2014/659801
21. FERENČÍK M., ROVENSKÝ J., SHOENFELD Y., MAŤHA V., 2005: *Imunitní systém: informace pro každého*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 236 s. ISBN 80-247-1196-6.
22. FINK S. L., COOKSON B. T., 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity*. 73(4), 1907-1916. ISSN 0019-9567.
23. FOX S., LEITCH A. E., DUFFIN R., HASLETT C., ROSSI A. G., 2010: Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *Journal of innate immunity*. 2 (3), 216-27. DOI 10.1159/000284367.
24. FRANC N. C., WHITE K., EZEKOWITZ R. A., 1999: Phagocytosis and development: back to the future. *Current opinion in immunology*. 11 (1), 47-52. ISSN 0952-7915.

25. GAMBARDELLA L., VERMEREN S., 2013: Molecular players in neutrophil chemotaxis—focus on PI3K and small GTPases. *Journal of leukocyte biology*. 94 (4), 603-12. DOI 10.1189/jlb.1112564.
26. GILBERT F. B., CUNHA P., JENSEN K., GLASS E. J., FOUCRAS G., ROBERT-GRANIÉ C., RAINARD P., 2013: Differential response of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* agonists of the innate immune system. *Veterinary research*, 44 (1), 1-23. DOI 10.1186/1297-9716-44-40.
27. HAANEN C., VERMES I., 1995: Apoptosis and inflammation. *Mediators of inflammation*. 4 (1), 5-15. ISSN 0962-9351.
28. HEJLÍČEK K. et al., 1987: *Mastitidy skotu*. 1. vyd. Praha: SZN, 201 s.
29. HOFÍREK B., HAAS D., 2003: Kategorizace zdraví mléčné žlázy, klinické formy mastitid a jejich terapie. In *Mastitidy skotu*. Hradec Králové: kongresové centrum Aldis a.s., 10- 23.
30. HOLUB A. et al., 1969: *Fyziologie hospodářských zvířat*. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 673 s.
31. HURLEY J. V., 1983: Termination of acute inflammation. I. Resolution. In *Acute Inflammation*. J. V. Hurley, ed. 2nd ed. Churchill Livingstone, London. 109-117.
32. IBA T., HASHIGUCHI N., NAGAOKA I., TABE Y., MURAI M., 2013: Neutrophil cell death in response to infection and its relation to coagulation. *Journal of intensive care*. 1 (1), 1. DOI 10.1186/2052-0492-1-13.
33. JELÍNEK P., KOUDELA K. et al., 2003: *Fyziologie hospodářských zvířat*. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 409 s. ISBN 80-7157-644-1.



34. JÍLEK P., 2014: *Imunologie: stručně, jasně, přehledně*. 4. vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 96 s. ISBN 978-80-247-4822-1.
35. KROON J., DANIEL A. E., HOOGENBOEZEM M., VAN BUUL J. D., 2014: Real-time imaging of endothelial cell-cell junctions during neutrophil transmigration under physiological flow. *Journal of Visualized Experiments*. (90), 1-7. DOI 10.3791/51766.
36. KVIETYS P. R., SANDIG M., 2001: Neutrophil diapedesis: paracellular or transcellular?. *News in physiological science*. 16, 15-9. ISSN 0886-1714.
37. LEE W. L., HARRISON R. E., GRINSTEIN S., 2003: Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and infection*. 5 (14), 1299-1306. ISSN 1286-4579.
38. LOU O., ALCAIDE P., LUSCINSKAS F. W., MULLER W. A., 2007: CD99 is a key mediator of the transendothelial migration of neutrophils. *Journal of immunology*. 178 (2), 1136-1143. ISSN 0022-1767.
39. MARTIN K. R., OHAYON D., WITKO-SARSAT V., 2015: Promoting apoptosis of neutrophils and phagocytosis by macrophages: novel strategies in the resolution of inflammation. *Swiss medical weekly*. 145, 1-10. DOI 10.4414/smw.2015.14056.
40. MARVAN F. et al., 1992: *Morfologie hospodářských zvířat*. 1.vyd. Praha: Brázda, 303 s. ISBN 80-209-0226-0.
41. MASKREY B. H., MEGSON I. L., WHITFIELD P. D., ROSSI A. G., 2011: Mechanisms of resolution of inflammation: A focus on cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 31 (5), 1001-1006. DOI 10.1161/ATVBAHA.110.213850.
42. MEHRZAD J., PAAPE M., BURVENICH C., 2010: Role of neutrophils in protection of udder from infection in high yielding dairy cows. *Journal of veterinary research*. 11 (2), 102-118.

43. MENA J., MANOSALVA C., RAMIREZ R., CHANDIA L., CARROZA D., LOAIZA A., BURGOS R. A., HIDALGO M. A., 2013: Linoleic acid increases adhesion, chemotaxis, granule release, intracellular calcium mobilisation, MAPK phosphorylation and gene expression in bovine neutrophils. *Veterinary immunology and immunopathology*. 151 (3-4), 275-284. DOI 10.1016/j.vetimm.2012.11.017.
44. MOREIRA DA SILVA F., MASSART-LEËN A. M., BURVENICH C., 1994: Development and maturation of neutrophils. *Veterinary Quarterly*. 16 (4), 220-225. ISSN 0165-2176.
45. MULLER W. A., 2011: Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. *Annual review of pathology*. 6, 323-344. DOI 10.1146/annurev-pathol-011110-130224.
46. NAGAHATA H., 2004: Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD): A review. *Journal of veterinary medicine and science*. 66 (12), 1475-1482. ISSN 0916-7250.
47. NAJBRT R. et al., 1982: *Veterinární anatomie 2*. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 594 s.
48. NICKERSON S. C., PAAPE M. J., HARMON R. J., ZIV G., 1986: Mammary leukocyte response to drug therapy. *Journal of dairy science*, 69 (6), 1733-1742. ISSN 0022-0302.
49. NIKOLETOPOULOU V., MARKAKI M., PALIKARAS K., TAVERNARAKIS N., 2013: Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 1833(12), 3448-3459. DOI 10.1016/j.bbamcr.2013.06.001.
50. NORDENFELT P., TAPPER H., 2011: Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *Journal of leukocyte biology*. 90 (2), 271-284. DOI 10.1189/jlb.0810457.

51. NUZZI P. A., LOKUTA M. A., HUTTENLOCHER A., 2007: Analysis of neutrophil chemotaxis. *Methods in molecular biology*. 370, 23-36. ISSN 1064-3745.
52. OVIEDO-BOYSO J., VALDEZ-ALARCÓN J. J., CAJERO-JUÁREZ M., OCHOA-ZARZOSA A., LÓPEZ-MEZA J. E., BRAVO-PATINO A., BAZABAL-AGUIRRE M., 2007: Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *Journal of Infection*. 54 (4), 399-409. ISSN 0163-4453.
53. PAAPE M. J., BANNERMAN D. D., ZHAO X., LEE J. W., 2003: The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Veterinary Research*. 34 (5), 597-627. ISSN 0928-4249.
54. PAAPE M. J., GUIDRY A. J., JAIN N. C., MILLER R. H., 1991: Leukocytic defense mechanisms in the udder. *Flemish Veterinary Journal*. 62 (1), 95-109. ISSN 0303-9021.
55. PAAPE M. J., SHAFER-WEAVER K., CAPUCO A. V., VAN OOSTVELDT K., BURVENICH C., 2000: Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. *Advances in experimental medicine and biology*. 480, 259-277. ISSN 0065-2598.
56. PAAPE M. J., WERGIN W. P., 1977: The Leukocyte as a Defense Mechanism. *Journal of American veterinary Medical Association*. 170, 1214-1223. ISSN 0003-1488.
57. PAAPE M., MEHRZAD J., ZHAO X., DETILLEUX J., BURVENICH C., 2002: Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 7 (2), 109-21. ISSN 1083-3021.
58. PAULRUD C. O., 2005: Basic concepts of the bovine teat canal. *Veterinary Research Communications*. 29 (3), 215-245. ISSN 0165-7380.

59. PRIN-MATHIEU C., LE ROUX Y., FAURE G. C., LAURENT F., BÉNÉ M. C., MOUSSAOUI F., 2002: Enzymatic activities of bovine peripheral blood leukocytes and milk polymorphonuclear neutrophils during intramammary inflammation caused by lipopolysaccharide. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 9 (4), 812-7. ISSN 1071-412X.
60. RAINARD P., 2003: The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. *Veterinary Research*. 34 (5), 647-70. ISSN 0928-4249.
61. RAINARD P., RIOLLET C., 2003: Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. *Reproduction, nutrition, development*. 43 (5), 439-57. ISSN 0926-5287.
62. RAINARD P., RIOLLET C., 2006: Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary research*. 37 (3), 369-400. ISSN 0928-4249.
63. REECE W. O., 1998: *Fyziologie domácích zvířat*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 449 s. ISBN 80-7169-547-5.
64. ROCK K. L., KONO H., 2008: The inflammatory response to cell death. *Annual review of pathology*, 3, 99-126. ISSN 1553-4006.
65. ROSS M. H., REITH E. J., ROMRELL L. J., 1989: *Histology: A text and Atlas*. 2. vyd. Baltimore: Williams&Wilkins, 783s. ISBN 0-683-09887-X.
66. ROZSYPAL H., HOLUB M., KOSÁKOVÁ M., 2013: *Infekční nemoci ve standardní a intenzivní péči*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 386 s. ISBN 978-80-246-2197-5.
67. RUEGG P. L., 2012: *Mastitis in dairy cows*. Philadelphia: Saunders, s. ISBN 978-14-557-4796-2.

68. SAVILL J., 1997: Apoptosis in resolution of inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 61 (4), 375-380. ISSN 0741-5400.
69. SLÁDEK Z., RYŠÁNEK D., 2001: Neutrophil apoptosis during the resolution of bovine mammary gland injury. *Research in veterinary science*. 70 (1), 41-46. ISSN 0034-5288.
70. SLÁDEK Z., RYŠÁNEK D., 2014: Morphological characteristics of static cells from mammary glands of unbred heifers. *Veterinarni Medicina*. 44 (7), 205-214. ISSN 0375-8427.
71. SLÁDEK Z., RYŠÁNEK D., RÝZNAROVÁ H., FALDYNA M., 2005: Neutrophil apoptosis during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *Veterinary Research*, 36(4), 629-643. ISSN 0928-4249.
72. SMITS E., BURVENICH C., GUIDRY A. J., HEYNEMAN R., MASSART-LEËN A., 1999: Diapedesis across mammary epithelium reduces phagocytic and oxidative burst of bovine neutrophils. *Veterinary immunology and immunopathology*. 68 (2-4), 169-176. ISSN 0165-2427.
73. SMOLA J., HAAS D., 2003: Nové aspekty v etiologii mastitid. In Mastitidy skotu. Hradec Králové: kongresové centrum Aldis a.s., s. 7 - 10.
74. SORDILLO L. M., STREICHER K. L., 2002: Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal Of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 7 (2), 135-146. ISSN 1083-3021.
75. SUZANNE M., STELLER H., 2013: Shaping organisms with apoptosis. *Cell death and differentiation*. 20 (5), 669-675. DOI 10.1038/cdd.2013.11.
76. TOMAN M. et al., 2009: *Veterinárni imunologie*. 2., dopl. a aktualiz. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 392 s. ISBN 978-80-247-2464-5.

77. VAN CRUCHTEN S., VAN DEN BROECK W., 2002: Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anatomia, histologia, embryologia*. 31 (4), 214-223. ISSN 0340-2096.
78. VAN MERRIS V., MEYER E., BURVENICH C., 2002: Functional maturation during bovine granulopoiesis. *Journal of Dairy Science*. 85 (11), 2859-2868. ISSN 0022-0302.
79. VAN OOSTVELDT K., PAAPE M. J., DOSOGNE H., BURVENICH C., 2002: Effect of apoptosis on phagocytosis, respiratory burst and CD18 adhesion receptor expression of bovine neutrophils. *Domestic animal endocrinology*. 22 (1), 37-50. ISSN 0739-7240.
80. VIEIRA O. V., BOTELHO R. J., GRINSTEIN S., 2002: Phagosome maturation: aging gracefully. *The biochemical journal*. 366, 689-704. ISSN 0264-6021.
81. VOKURKA M. et al., 2012: *Patofyziologie pro nelékařské směry*. 3., upr. vyd. Praha: Karolinum, 305 s. ISBN 978-80-246-2032-9.
82. VOYICH J. M., STURDEVANT D. E., BRAUGHTON K. R., KOBAYASHI S. D., LEI B., VIRTANEVA K., DORWARD D. W., MUSSER J. M, DELEO F. R., 2003: Genome-wide protective response used by group A Streptococcus to evade destruction by human polymorphonuclear leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100 (4), 1996-2001. ISSN 0027-8424.
83. WAGNER J. G., ROTH R. A., 2000: Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacological reviews*. 52 (3), 349-374. ISSN 0031-6997.
84. ZARBOCK A., LEY K., 2008: Mechanism and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *Am. J. Pathol*. 172 (1), 1-7. ISSN 0002-9440.

85. ZELINKOVÁ G., Virbac. *Problematika buněčných elementů v chovech skotu* [online]. [cit. 2015-12-05]. Dostupné na:  
<<http://www.virbac.cz/home/odborne-clanky/skot/main/skot/problematika-bunnych-element-v-c.html>>
86. ZONG W. X., THOMPSON C. B., 2006: Necrotic death as a cell fate. *Genes & development*. 20 (1), 1-15. ISSN 0890-9369.